Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

UNTERSUCHUNG ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG KÖRPEREIGENER ABWEHRMECHANISMEN DURCH DIE ANTIBIOTIKA AMPICILLIN, MEZLOCILLIN UND PENICILLIN G GEGENÜBER KLEBSIELLA PNEUMONIAE UND ESCHERICHIA COLI

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
KARL THEODOR VOSSEMER
aus Kallmuth

Frankfurt am Main 1983

RIJKS
LEIDEN

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

UNTERSUCHUNG ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG KÖRPEREIGENER ABWEHRMECHANISMEN DURCH DIE ANTIBIOTIKA AMPICILLIN, MEZLOCILLIN UND PENICILLIN G GEGENÜBER KLEBSIELLA PNEUMONIAE UND ESCHERICHIA COLI

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
KARL THEODOR VOSSEMER
aus Kallmuth

Frankfurt am Main 1983

Dekan: Prof. Dr. med. H. J. Müller

Referent: Priv. Doz. Dr. med. P. M. Shah

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. G. Frenkel

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 1983

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Shah bin ich für die Vergabe des Themas sowie für die Anleitung und wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Kühnel danke ich für seine freundliche Bereitschaft, mich in der Methodik zur Isolation von Leukozyten zu unterweisen.

Frau Dr. med. E. B. Helm danke ich für anregende Diskussionen.

Allen Probanden, die zur Blutspende für die Versuche dieser Arbeit bereit waren, sage ich herzlichen Dank.

Auch den Angestellten im hämatologischen Labor danke ich für die Möglichkeit zur Benutzung des Coulter-Counters.

A b s t r a c t

VOSSEMER, KARL-THEODOR

UNTERSUCHUNG ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG KÖRPEREIGENER ABWEHRMECHANISMEN DURCH DIE ANTIBIOTIKA AMPICILLIN, MEZLOCILLIN UND PENICILLIN G GEGENÜBER KLEBSIELLA PNEUMONIAE UND ESCHERICHIA COLI

Es wurde die Beeinflussung der antibakteriellen Aktivität menschlichen Blutes gegenüber den Erregern Escherichia coli und Klebsiella pneumoniae durch Antibiotika untersucht. Die verwendeten Antibiotika waren Ampicillin, Mezlocillin und Penicillin G. Die getesteten Stämme hatten sich in Vorversuchen als seroresistent erwiesen.

Die Versuchsergebnisse zeigten eine synergistische Wirkung zwischen Ampicillin und Vollblut gegenüber Klebsiella pneumoniae. Auch mit Mezlocillin gegenüber Klebsiella pneumoniae sowie Ampicillin und Mezlocillin gegenüber Escherichia coli gab es in einzelnen Versuchen synergistische Effekte. Die isolierte Betrachtung der Funktion von Leukozyten gegenüber den Keimen nach antibiotischer Vorschädigung brachte keine einheitlichen Ergebnisse. Während sich in einigen Versuchen die antibakterielle Aktivität der Leukozyten verstärkte, änderte sich in anderen nichts. Weiterhin wurde deutlich, daß spenderspezifische Faktoren für die Abwehrkraft von Leukozyten und Plasma gegenüber antibiotisch vorgeschädigten Keimen von beachtlicher Bedeutung sind.
Die Erkenntnis, daß die Beeinflussung der antibakteriellen Aktivität des Blutes durch antibiotische Keimvorschädigung nicht nur auf der Funktionsänderung der Leukozyten alleine beruht, sondern von vielen, sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren abhängig ist, veranlaßt zu der Feststellung, daß nur Untersuchungen in Vollblut genauere Aufschlüsse über die in vivo-Situation geben können.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methode	3
1.	Bakterien	3
2.	Antibiotika	3
3.	Medien	3
4.	Isolation von Leukozyten aus Vollblut	4
5.	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	5
6.	Untersuchung der Teststämme auf Plasmaresistenz	5
7.	Inaktivierung des Plasmas	6
8.	Zu den Hauptversuchen	6
8.1.	Wachstumskontrolle der Keime	6
8.2.	Wachstumsvergleich unter andauernder bzw. initialer Beeinflussung durch Antibiotikum	6
8.3.	Überimpfung der Keime in Vollblut nach antibiotischer Vorschädigung in MHB	6
8.4.	Reduzierung der Leukozytenkonzentration im Vollblut	7
III.	Eigene Ergebnisse	8
1.	Ampicillin gegenüber Escherichia coli in Müller-Hinton Bouillon	8
2.	Mezlocillin gegenüber Escherichia coli in Müller-Hinton Bouillon	12
3.	Ampicillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Müller-Hinton Bouillon	16
4.	Mezlocillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Müller-Hinton Bouillon	20
5.	Ampicillin gegenüber Escherichia coli in Vollblut	24
6.	Mezlocillin gegenüber Escherichia coli in Vollblut	29
7.	Ampicillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Vollblut	34
8.	Mezlocillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Vollblut	39

Seite

9. Escherichia coli und Klebsiella pneumoniae in Vollblut nach Vorschädigung durch Mezlocillin 43

10. Wirkung verschiedener Blutbestandteile auf Escherichia coli unter initialem Einfluß von 1/2 MHK Mezlocillin 46

11. Mezlocillin gegenüber Escherichia coli in aktivem und inaktiviertem Plasma 50

12. Beeinflussung des Wachstums von E. coli durch Leukozyten in aktivem Plasma 53

13. Beeinflussung des Wachstums von E. coli durch Leukozyten in aktivem Plasma nach Vorschädigung der Keime durch Penicillin G 60

14. Beeinflussung des Wachstums von E. coli durch Leukozyten in aktivem Plasma nach Vorschädigung der Keime durch Ampicillin 75

IV. Diskussion 80

V. Zusammenfassung 90

VI. Literaturverzeichnis 91

I. Einleitung

Die Analyse von Septikämien bei Patienten mit Abwehrschwäche am Zentrum der Inneren Medizin Frankfurt zeigte eine erhöhte Letalität bei Patienten mit einer Granulozytopenie (weniger als 1000 Granulozyten/ml) trotz 'effektiver' antibiotischer Therapie (11). Hierbei ging man davon aus, daß eine Therapie bei in vitro Empfindlichkeit der Erreger gegenüber dem verabreichten Antibiotikum als effektiv betrachtet werden könne. Die angewandten Untersuchungsverfahren zur Bestimmung dieser Effektivität dienten der Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und gelegentlich auch der minimalen Bakterizidiekonzentration (MBC). Hierbei wurden ausschließlich künstliche, optimal zusammengesetzte Nährmedien angewandt. Unberücksichtigt blieben jedoch körpereigene Abwehrkräfte. Das oben beschriebene Untersuchungsergebnis unterstreicht jedoch die Notwendigkeit der Berücksichtigung dieser Faktoren bei der Beurteilung der Wirksamkeit von Antibiotika. In einer Reihe von Untersuchungen wurde bereits festgestellt, daß die antibakterielle Aktivität von Leukozyten durch gleichzeitige oder vorausgegangene Schädigung der Keime mittels Antibiotika verstärkt werden kann. So zeigte beispielsweise Adam (1), daß die Phagozytoseaktivität von Makrophagen gegenüber E. coli und die Bakterizidie der phagozytierten Keime durch die Gegenwart von Dihydrostreptomycin verstärkt wird. Milatovic (6) untersuchte mehrere Antibiotika und beobachtete eine Verstärkung der Phagozytose von Staph. aureus durch humane, neutrophile

UNIV. LEIDEN BIBL.

Granulozyten nach Vorbehandlung der Keime mit Clindamycin und Doxycyclin. Bei all diesen Untersuchungen stand im wesentlichen die isolierte Betrachtung der Leukozytenfunktion unter antibiotischem Einfluß im Vordergrund, wobei generell die Versuche in künstlichen Nährmedien durchgeführt wurden, die meist einen Zusatz von aktivem Serum enthielten.

Ziel dieser Untersuchung war es, die Beeinflussung der verschiedenen Faktoren des körpereigenen Abwehrsystems durch Antibiotika zu analysieren und eine Methode zu finden, bei der möglichst alle Komponenten des Abwehrsystems in ihrem Zusammenwirken mit einem Antibiotikum erfaßt werden.

II. Material und Methode

1. Bakterien

Es wurden je vier Stämme von Escherichia coli und Klebsiella pneumoniae in den Versuchen verwendet. Bis auf Escherichia coli C 10 - dieser wurde uns von Dr. Metzger, Bayer AG , überlassen - waren die Stämme aus Patientenmaterial im Infektionslaboratorium unserer Klinik isoliert worden. In Vorversuchen waren von uns die Plasmaresistenz dieser Stämme sowie die minimalen Hemmkonzentrationen gegen die zu verwendenden Antibiotika ermittelt worden.

Stämme: Escherichia coli - C 10
- 837
- 1190
- 1189

Klebsiella pneumoniae - 4786
- 4601
- 6126
- 5343

2. Antibiotika

Es wurden die β-Lactam-Antibiotika Penicillin G, Ampicillin und Mezlocillin verwendet.

3. Medien

Bei den Untersuchungen der Keime auf Seroresistenz, den Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentration (MHK), zum Vorbebrüten der Keime sowie teilweise in Hauptversuchen wurde Müller-Hinton Bouillon (MHB) als Nährmedium verwendet.

Zur Bebrütung der Probenausstriche dienten für die gramnegativen Keime (E. coli und K. pneumoniae) Platten mit Eosin-Methylen-Blau-Agar.

In den Hauptversuchen kamen Vollblut und frisches, aktives humanes Plasma, in dem Leukozyten suspendiert waren, zur Anwendung. Außerdem wurde leukozytenfreies Plasma in den Hauptversuchen sowie bei der Seroresistenz-Untersuchung verwendet.

Als gerinnungshemmender Zusatz und Stabilisator für das verwendete Frischblut diente ACD (Acid Citrate Dextrose).

Technische Hilfsmittel zur Herstellung der Leukozytenkonzentrate bzw. zur Plasmagewinnung waren:

- Heraeus Laborzentrifuge
- Pasteur Pipetten
- Coulter Counter (Leukozytenzählgerät)

4. Isolation von Leukozyten aus Vollblut

Zur Blutentnahme wurden Probanden herangezogen, die nicht in ärztlicher Behandlung waren und keine Antibiotika, Glucokortikoide oder andere Medikamente zu sich nahmen. Das von diesen gewonnene Blut wurde zunächst durch Zusatz von ACD (ACD-Röhrchen der Firma Biotest AG) ungerinnbar gemacht. Dann wurde es in der Zentrifuge 15 Minuten bei 1500 UPM zentrifugiert. Mit Hilfe von Pasteur Pipetten konnte nun das überstehende Plasma entnommen werden. Danach wurde durch sehr vorsichtiges Absaugen (ebenfalls mit Pasteur Pipetten) die leukozytenreiche Schicht isoliert. Diese hatte sich als Buffy-coat in Form einer dünnen, hellen Lamelle auf den Erythrocyten abgelagert. Die Leukozytenkonzentration der so gewonnenen Suspension wurde jetzt

mit Hilfe eines Coulter-Counters gemessen.

Die für den jeweiligen Versuch erforderliche Konzentration wurde durch Verdünnung mit dem vorher isolierten Plasma hergestellt.

Zur Überprüfung der Vitalität der Leukozyten wurde ein Tropfen der Suspension mit Trypan Blau angefärbt und mikroskopiert. Die Dunkelblaufärbung gilt als Beweis für ihre Vitalität.

5. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die MHK's wurden mit Hilfe des Reihenverdünnungstests in flüssigem Medium (MHB) bestimmt. Als MHK wurde die niedrigste Verdünnungsstufe angenommen, bei der nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 37° C ein Auswachsen der Bakterien verhindert wurde.

6. Untersuchung der Teststämme auf Plasmaresistenz

Nach einer Vorbebrütungszeit von vier Stunden in MHB wurden die zu untersuchenden Stämme in frisches, humanes, aktives Plasma überimpft.

Die Anfangskonzentration betrug 10^5 Keime/ml. Während der anschließenden Bebrütungszeit von acht Stunden bei 37° C wurden zur Stunde 0, nach 0,5, 1 1,5, 2, 2,5, 3, 4 und 8 Stunden Probenentnahmen a 0,1 ml vorgenommen. Hiervon wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Aus den einzelnen Verdünnungsstufen wurden je 0,1 ml auf EMB-Agar mit Glasspateln ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien entsprach nach Rückrechnung entsprechend der Verdünnungsstufe der Keimkonzentration im Plasma zu dem jeweiligen Zeitpunkt der Probenentnahme. Die hieraus erstellten Diagramme zeigen das Wachstumsverhalten der Keime im Plasma.

Für die Hauptversuche wurden die Stämme ausgewählt, die ein deutliches Wachstum im Plasma zeigen.

7. Inaktivierung des Plasmas

Die bei den Versuchen III.10. und III.11. vorgenommene Inaktivierung des Plasmas erfolgte durch dessen Erhitzung auf 56° C im Wasserbad über einen Zeitraum von 30 Minuten.

8. Zu den Hauptversuchen

8.1. Wachstumskontrolle der Keime

Das Methodische Vorgehen bei der Kontrolle des Keimwachstums in den Hauptversuchen entspricht dem Verfahren, das bei der Untersuchung der Teststämme auf Plasmaresistenz angewendet wurde. Dieses ist unter Punkt 6., zweiter Abschnitt, erläutert. Bei den Proben, die zum Zeitpunkt der Kontrollentnahme noch Antibiotikum enthielten, wurde dieses durch Zugabe eines Tropfens ß-Lactamase in die erste Verdünnungsstufe eliminiert.

8.2. Wachstumsvergleich unter andauernder bzw. initialer Beeinflussung durch Antibiotikum

Hier wurde zum vorgesehenen Eliminationszeitpunkt die antibiotikumhaltige Probe geteilt. Der eine Teil wurde unverändert weiter bebrütet, während in dem anderen Teil durch Zugabe von ß-Lactamase die Elimination des Antibiotikums erfolgte.

8.3. Überimpfung der Keime in Vollblut nach antibiotischer Vorschädigung in MHB

Im Versuch des Kapitels III.9 wurden die Keime nach zweistündiger antibiotischer Vorschädigung in MHB

in Vollblut überimpft. Hierbei wurde folgendermaßen vorgegangen: Zuerst erfolgte die Elimination des Antibiotikums durch Zugabe von ß-Lactamase. Dann wurde die Bouillon bei 2500 UPM über 20 Minuten abzentrifugiert und mit der Pasteur-Pipette bis dicht über das Keimpellet am Röhrchenboden entfernt. Nach Resuspension der Keime in 0,9 % iger NaCl-Lösung und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand wieder entfernt. Die so gewaschenen Keime wurden nun in frischem Vollblut suspendiert und weiter bebrütet.

8.4. Reduzierung der Leukozytenkonzentration im Vollblut

Bei dem Versuch des Kapitels III.10. war beabsichtigt, die Leukozytenkonzentration in Vollblut möglichst stark zu reduzieren, um den Einfluß der übrigen Blutbestandteile auf das Keimwachstum besser beurteilen zu können. Hierzu wurde das Blut zunächst 15 Minuten bei 1500 UPM zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette abpipettiert. Anschließend wurde die leukozytenreiche obere Schicht des Hämatokrits (etwa 5 mm tief) mit einer zweiten Pipette entfernt. Der Rest wurde nun in zuvor entferntem Plasma resuspendiert und der oben beschriebene Vorgang wurde wiederholt. Dies erfolgte insgesamt viermal, wobei eine 80 %ige Reduktion der Leukozytenzahl von 6×10^6 auf $1{,}2 \times 10^6$ pro ml erreicht wurde.

Da der Versuchsablauf häufig variiert wurde, sind die diesbezüglichen Einzelheiten bei der Beschreibung der Ergebnisse im Kapitel III jeweils zu Beginn eines neuen Abschnitts beschrieben.

III. Eigene Ergebnisse

III.1. Ampicillin gegenüber Escherichia coli in Müller-Hinton Bouillon

Untersucht wurde die Wirkung von 1/2 MHK[1)] Ampicillin auf drei Stämme von E. coli. Die MHK wurde vorher in Müller-Hinton Bouillon mehrfach bestimmt. Auf der Abbildung 1 ist die graphische Darstellung dieser Ergebnisse.

Nur gegenüber einem Stamm (E. coli C 10) kommt es zu einer Keimzahlreduzierung um mehr als 99 % unter Einwirkung subinhibitorischer Konzentration von Ampicillin. Die hier gewählte Konzentration führt gegenüber E. coli 1190 zu einer Wachstumshemmung und nicht zur Abtötung. Beim Stamm 837 führt 1/2 MHK von Ampicillin zu einer gegenüber Antibiotikum-freiem Wachstum deutlichen Wachstumsverzögerung.

Die Elimination des Antibiotikums zur zweiten Versuchsstunde führt zum raschen Wiederauswachsen der Keime bei jedem der drei untersuchten Stämme. Die Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber den Kontrollstämmen (d. h. nicht durch Antibiotika vorgeschädigt) ist deutlich erhöht. So benötigt der Stamm C 10 beispielsweise 45 Minuten, um seine Keimzahl nach Elimination des Ampicillins um eine Zehnerpotenz zu erhöhen. Die nicht vorgeschädigten Keime benötigen dazu jedoch 70 Minuten. (Abbildung 2)

1) MHK: Minimale Hemmkonzentration

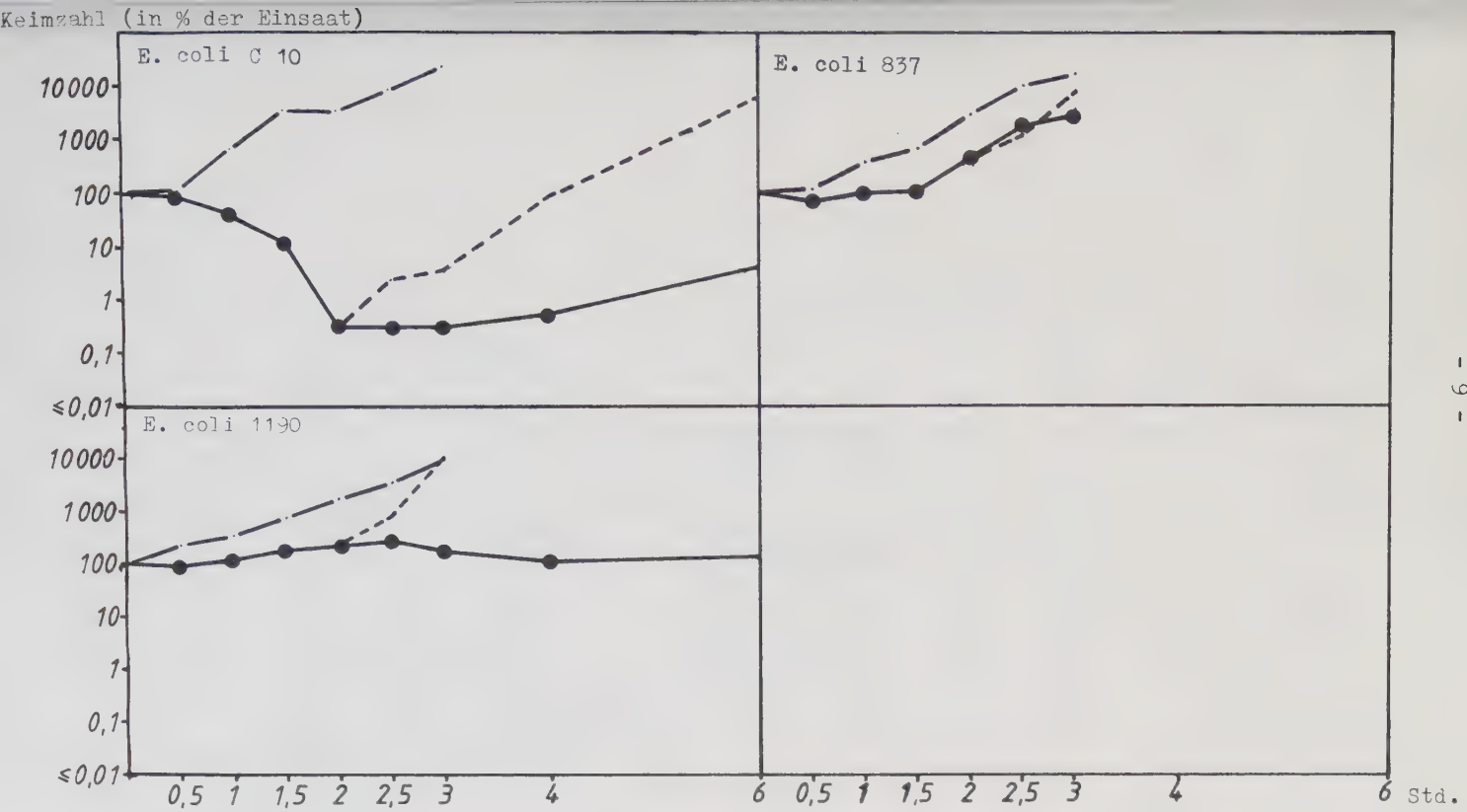


Abb. 1:
Wirkung von 1/2 MHK Ampicillin gegenüber Escherichia coli in MHB

100 % ≙ Bakterieneinsaat

mit Antibiotikum

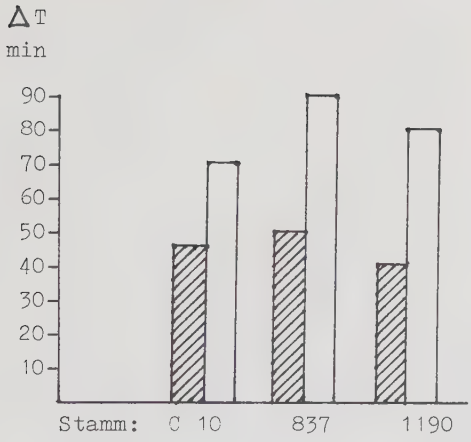
ohne Antibiotikum

nach Antibiotikumelimination zur Stunde 2

Tabelle 1: Wirkung von 1/2 MHK Ampicillin gegenüber Escherichia coli in MHB

Stamm	Ampicillin-Konzentration (µg/ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
C 10	0	$3,7 \times 10^4$	108	622	1270	3243	8378	22973		
	1 (bis Std.2)	——	——	——	——	——	2,3	3,4	80	6000
	1	$3,5 \times 10^4$	91	40	11,4	0,29	0,29	0,29	0,57	4
837	0	$1,6 \times 10^5$	110	360	630	2800	10000	16000		
	64(bis Std.2)	——	——	——	——	——	1230	7692		
	64	$1,3 \times 10^5$	72	100	108	485	1769	2923		
1190	0	9×10^4	222	311	722	1667	3444	9778		
	1 (bis Std.2)	——	——	——	——	——	778	10000		
	1	9×10^4	87	111	189	222	256	178	111	144

Abb. 2: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten von Escherichia coli in MHB mit und ohne antibiotische Vorschädigung durch Ampicillin



ΔT: Zeitraum, in dem sich die Keimzahl, gemessen ab Versuchsstunde 2, um eine Zehnerpotenz erhöht

▨: Seit zwei Stunden durch Ampicillin vorgeschädigte Keime

□: nicht antibiotisch vorgeschädigte Keime

III.2. Mezlocillin gegenüber Escherichia coli in Müller-Hinton Bouillon

Es wurde die Wirkung von 1/2 MHK des Antibiotikums Mezlocillin auf vier Stämme von Escherichia coli untersucht, nachdem die MHK mehrfach in Müller-Hinton Bouillon bestimmt worden war. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

Bei allen vier untersuchten Stämmen kommt es unter dem Einfluß von 1/2 MHK Mezlocillin zu einer Bakterizidie mit einer Keimzahlreduktion um mehr als 99,9 %. Der hierfür notwendige Zeitraum beträgt für den Stamm C 10 2,5 Stunden, für 837 2 Stunden, für 1190 etwas mehr als 4 Stunden und für 1189 nahezu 6 Stunden. Während die Konzentration der Keime E. coli 837 und E. coli 1189 über den gesamten Beobachtungszeitraum im noch meßbaren Bereich liegt, sinkt die von E. coli 1190 zwischen der vierten und sechsten Stunde und die von E. coli C 10 bereits zwischen Stunde 3 und 4 unter die Nachweisgrenze von 10^2 Keimen pro ml ab.

Nach der Elimination des Mezlocillins zur zweiten Versuchsstunde wachsen alle Stämme wieder aus. Sie zeigen gegenüber den Antibiotika-freien Proben in der gleichen Versuchsphase deutlich erhöhte Wachstumsgeschwindigkeiten. (Abb. 4)

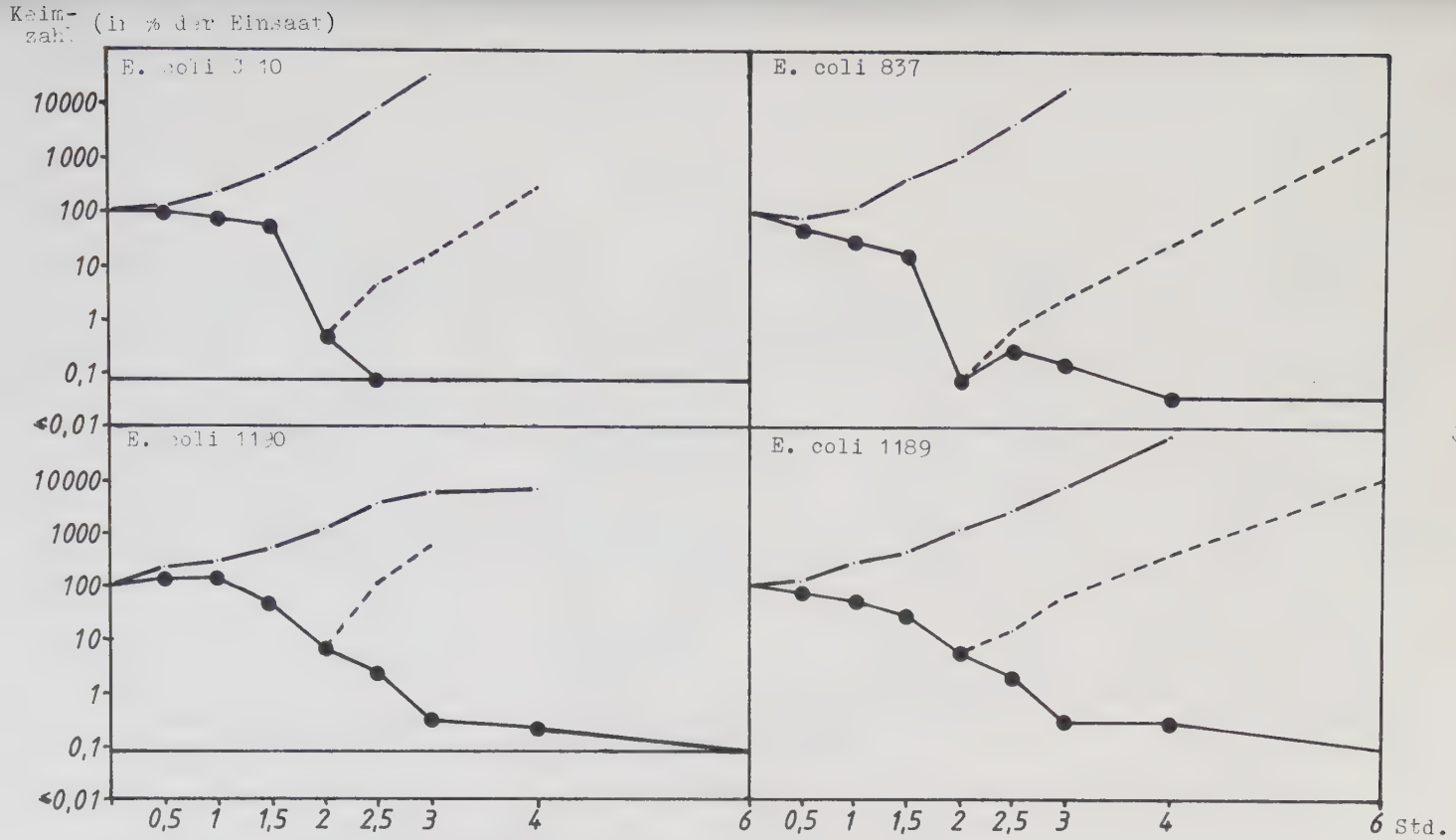


Abb. 3: Wirkung von 1/2 MHK Mezlocillin gegenüber Escherichia coli in Müller-Hinton Bouillon

100 % ≙ Bakterieneinsaat

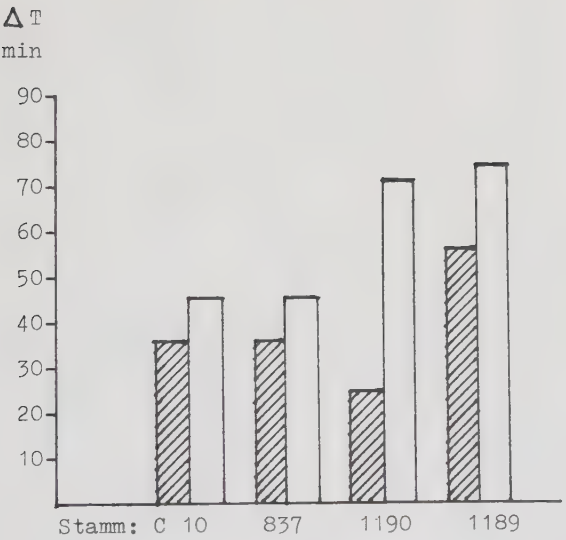
mit Antibiotikum — ohne Antibiotikum

mit Antibiotikumelimination zur Stunde 2

Tabelle 2: Wirkung von 1/2 MHK Mezlocillin gegenüber Escherichia coli in MHB

Stamm	Mezlocillin-Konzentration (µg/ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
	0	$1,7 \times 10^5$	123,5	223,5	541	1823	8235	37647	411765	
C 10	1 (bis Std.2)	$1,4 \times 10^5$	—	—	—	—	4,2	15,7	271	35714
	1	$1,4 \times 10^5$	100	71	55	0,5	0,071	0,071	<0,071	<0,071
	0	$2,5 \times 10^5$	76	124	440	1120	4800	21600		
837	32(bis Std.2)	$2,6 \times 10^5$	—	—	—	—	0,69	2,6	26,9	3231
	32	$2,6 \times 10^5$	50	28	16	0,077	0,31	0,15	0,038	0,038
	0	$1,6 \times 10^5$	212	275	500	1188	3813	5813	131250	
1190	1 (bis Std.2)	$1,4 \times 10^5$	—	—	—	—	100	571	6143	307143
	1	$1,4 \times 10^5$	136	143	44	6,6	2,4	0,29	0,21	<0,071
	0	$1,1 \times 10^5$	118,2	254,5	436,4	1182	2545	7545	63636	
1189	1 (bis Std.2)	$1,1 \times 10^5$	—	—	—	—	14,5	67,3	400	10000
	1	$1,1 \times 10^5$	68	52	28	5,5	2	0,27	0,27	0,091

Abb. 4: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten von Escherichia coli in MHB mit und ohne antibiotische Vorschädigung durch Mezlocillin



ΔT: Zeitraum, in dem sich die Keimzahl, gemessen ab Versuchsstunde 2, um eine Zehnerpotenz erhöht

▨: Seit zwei Stunden durch Mezlocillin vorgeschädigte Keime

□: nicht antibiotisch vorgeschädigte Keime

III.3. Ampicillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Müller-Hinton Bouillon

Zur Untersuchung der Wirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Ampicillin auf Klebsiella pneumoniae wurden drei Stämme dieser Spezies mit 1/2 MHK des Antibiotikums in Müller-Hinton Bouillon bebrütet. Ein vierter Stamm, K. pneumoniae 5343, der sich bei den zuvor mehrfach durchgeführten MHK-Bestimmungen als resistent erwiesen hatte (MHK >256 μg/ml), wurde mit 32 μg/ml Ampicillin bebrütet. Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse in der graphischen Darstellung.

Während der resistente Keim 5343 ohne Verzögerung gegenüber AB-freiem Wachstum auswächst, kommt es bei den übrigen drei Stämmen zu einer raschen Reduktion der Keimzahl. Diese führt bis zur vierten Stunde beim Stamm 4786 zu einem Rückgang auf nahezu 0,1 % der Ausgangskonzentration. Anschließend erfolgt in einer leichten Erholungsphase ein langsamer Keimzahlanstieg bis zur Stunde 6. Beim Stamm 4601 reduziert sich die Keimzahl nach etwa vier Stunden, beim Stamm 6126 nach etwa 3,25 Stunden auf 0,1 % der Ausgangskonzentration und sinkt bis zur sechsten bzw. zur vierten Stunde unter die Nachweisgrenze von 10^2 Keimen/ml ab.

Die drei Ampicillin-sensiblen Stämme wachsen nach Elimination des Antibiotikums rasch wieder aus. Gegenüber AB-freiem Wachstum zeigt sich auch hier eine Wachstumsbeschleunigung in der Phase unmittelbar nach der Ampicillin-Elimination. Dies ist in Abbildung 6 dargestellt.

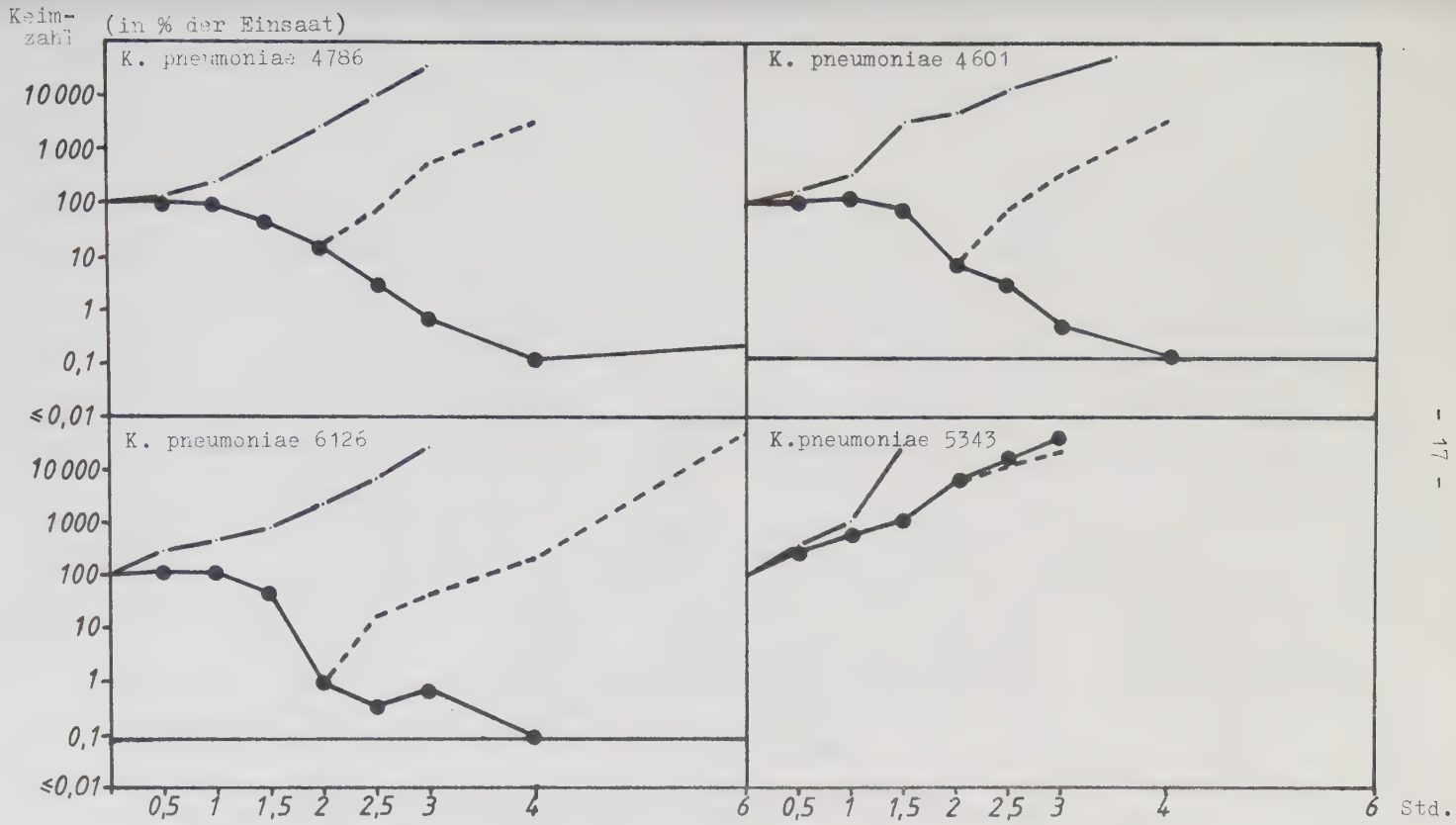


Abb.5: Wirkung von 1/2 MHK Ampicillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in MHB

100 % ≙ Bakterieneinsaat

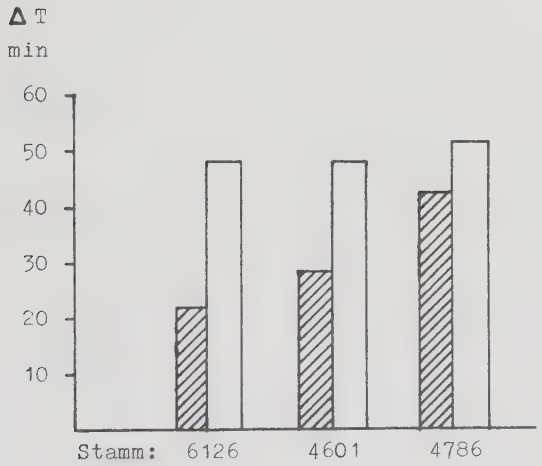
mit Antibiotikum — ohne Antibiotikum

nach Antibiotikumelimination zur Stunde 2

Tabelle 3: Wirkung von 1/2 MHK Ampicillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in MHB
(MHK von K. pneumoniae 5343 >256 µg/ml)

Stamm	Ampicillin-Konzentration (µg/ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
	0	$1,3 \times 10^5$	138,5	246,2	769,2	2769	10000	38462	269231	
4786	32(bis Std.2)	$9,5 \times 10^4$	—	—	—	—	68,4	547	3158	336842
	32	$9,5 \times 10^4$	126	95	42	15	3,2	0,63	0,11	0,21
	0	$1,1 \times 10^5$	181,8	327,3	3182	5000	12727	56364		
4601	32(bis Std.2)	8×10^4	—	—	—	—	75	375	3375	625000
	32	8×10^4	108	113	79	7	3	0,5	0,13	<0,13
	0	$1,2 \times 10^5$	275	433,3	775	2167	6250	25000	133333	
6126	32(bis Std.2)	$1,2 \times 10^5$	—	—	—	—	16,7	42,5	216,7	46667
	32	$1,2 \times 10^5$	117	108	45	0,83	0,33	0,67	<0,083	<0,083
	0	$6,5 \times 10^4$	384,6	1000	27692	—	21538	21538	415384	
5343	32(bis Std.2)	$9,2 \times 10^4$	—	—	—	—	13043	21739	565217	
	32	$9,2 \times 10^4$	272	554	1033	5435	14130	38043	413043	

Abb. 6: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit von Klebsiella pneumoniae in MHB mit und ohne antibiotische Vorschädigung durch Ampicillin



ΔT: Zeitraum, in dem sich die Keimzahl, gemessen ab Versuchsstunde 2, um eine Zehnerpotenz erhöht

▨: Seit zwei Stunden durch Ampicillin vorgeschädigte Keime

□: nicht antibiotisch vorgeschädigte Keime

III.4. Mezlocillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Müller-Hinton Bouillon

Die gleichen vier Stämme von Klebsiella pneumoniae wie in III. 3. wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Mezlocillin in MHB untersucht. Der Stamm 5343 erwies sich bei der MHK-Bestimmung ebenso wie gegenüber Ampicillin bis zu einer Konzentration von 256 µg pro ml als resistent. Er wurde bei einer Mezlocillinkonzentration von 32 µg/ml untersucht, während die drei übrigen Stämme einer Lösung von 1/2 MHK des Antibiotikums ausgesetzt wurden. (Abb. 7)

Es kommt während des Beobachtungszeitraumes von sechs Stunden bei allen vier Stämmen, also einschließlich des resistenten Stammes 5343, zu einer Keimzahlreduktion. Beim Stamm 4786 sinkt die Keimzahl bereits nach etwa 3,25 sowie beim Stamm 4601 nach ungefähr 4,25 Stunden auf 0,1 % der Ausgangskonzentration ab. Zur Stunde 4 können vom Stamm 4786 und zur Stunde 6 vom Stamm 4601 keine Keime mehr nachgewiesen werden. Der Stamm 6126 wird bis zur vierten Stunde auf nahezu 0,1 % seiner Anfangskonzentration reduziert. Der resistente Stamm 5343 erfährt eine Keimzahlreduktion um mehr als 99 % bis zur vierten Stunde.

Ebenso wie in den vorher beschriebenen Versuchen führt auch hier die Elimination des Antibiotikums zu einem unmittelbar einsetzenden Wachstum der Keime. Ein Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten gegenüber nicht antibiotisch vorgeschädigten Keimen zeigt beim Stamm 4786 eine Beschleunigung, bei 4601 und 6126 eine leichte Verzögerung und bei 5343 keinen Unterschied. Der Vergleich ist in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

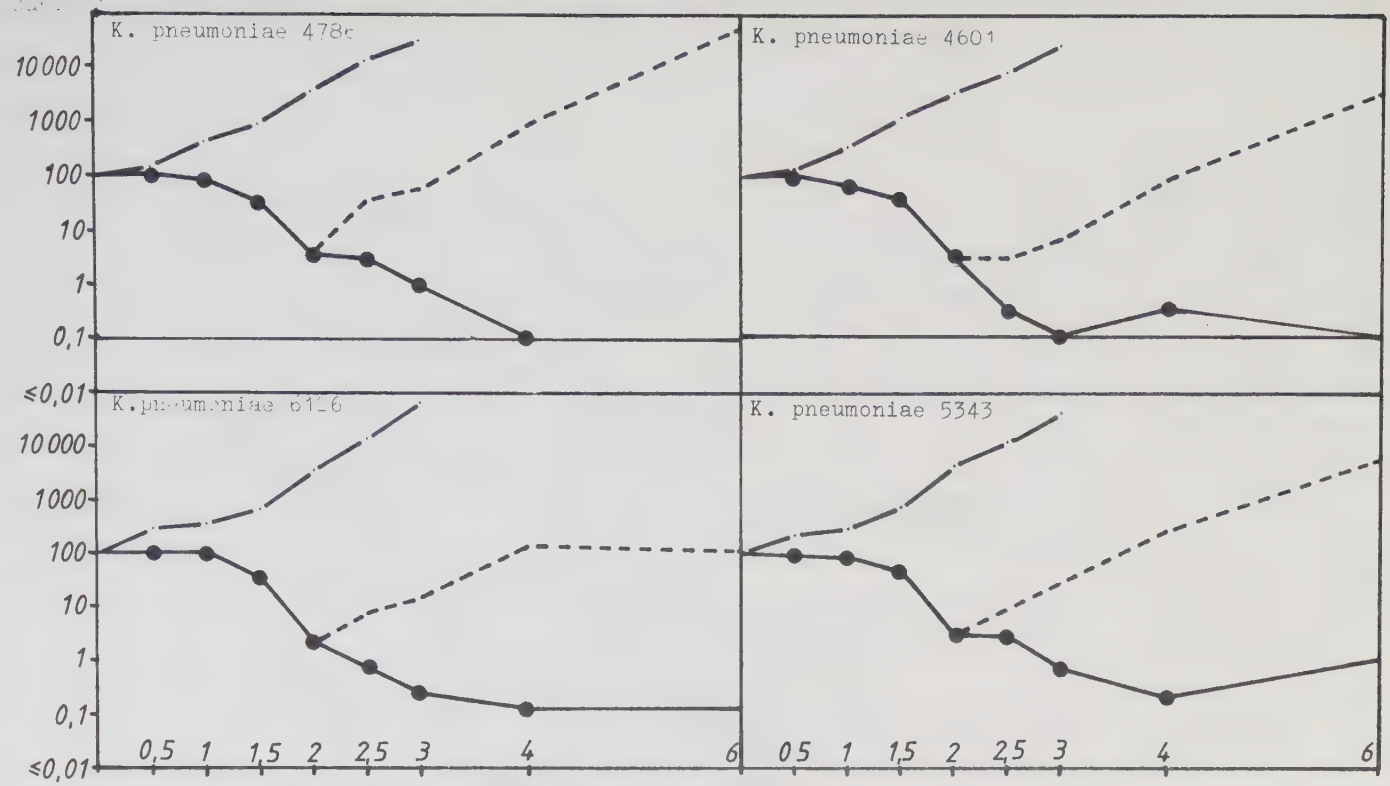


Abb. 7 : Wirkung von 1/2 MHK Mezlocillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in MHB

100 % ≙ Bakterieneinsaat

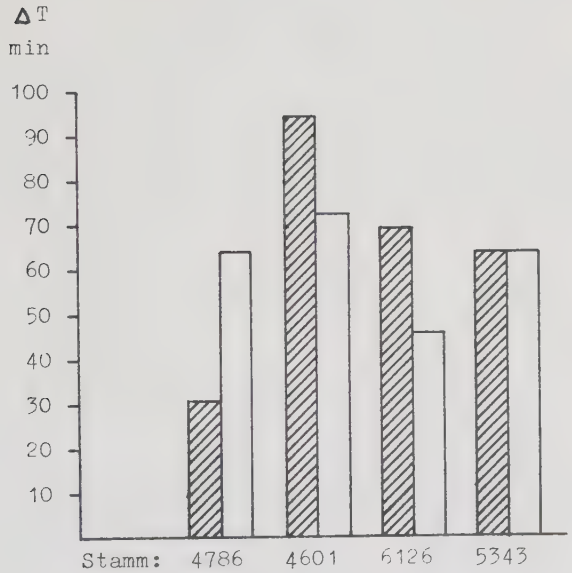
mit Antibiotikum — ohne Antibiotikum

nach Antibiotikumelimination zur Stunde 2

Tabelle 4: Wirkung von 1/2 MHK Mezlocillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in MHB (MHK von K. pneumoniae 5343 >256 µg/ml)

Stamm	Mezlocillin-Konzentration (µg/ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
	0	$1,2 \times 10^5$	150	417	917	3833	13333	33333		
4786	8 (bis Std.2)	$1,1 \times 10^5$	—	—	—	—	37	59,1	909	51818
	8	$1,1 \times 10^5$	109	87	31	3,8	3,0	0,91	<0,091	<0,091
	0	$9,8 \times 10^4$	143	388	1224	3673	8673	26531	214286	
4601	8 (bis Std.2)	$8,3 \times 10^4$	—	—	—	—	3,1	7,2	96,4	3614
	8	$8,3 \times 10^4$	110	69	40	3,3	0,36	0,12	0,36	<0,12
	0	$9,4 \times 10^4$	277	362	681	3298	14894	69149	446809	
6126	8 (bis Std.2)	8×10^4	—	—	—	—	7,6	15	137,5	114
	8	8×10^4	105	108	35	2,3	0,75	0,25	0,13	0,13
	0	$1,2 \times 10^5$	225	292	750	4250	12500	41667	191667	
5343	32(bis Std.2)	$9,8 \times 10^4$	—	—	—	—	8,2	27,6	255	5918
	32	$9,8 \times 10^4$	98	85	47	3,0	2,8	0,71	0,20	1,0

Abb. 8: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit von Klebsiella pneumoniae in MHB mit und ohne antibiotische Vorschädigung durch Mezlocillin



ΔT: Zeitraum, in dem sich die Keimzahl, gemessen ab Versuchsstunde 2, um eine Zehnerpotenz erhöht

▨ : Seit zwei Stunden mit Mezlocillin vorgeschädigte Keime

□ : nicht antibiotisch vorgeschädigte Keime

III.5. Ampicillin gegenüber Escherichia coli in Vollblut

Es wurden die Stämme C 10, 837 und 1189 getestet. Untersucht wurde die Wirkung von 1/2 MHK Ampicillin gegenüber diesen Stämmen über einen Beobachtungszeitraum von sechs Stunden. Im Unterschied zum Versuch I.1. diente als Medium frisches humanes Vollblut. Zur Beurteilung der Bedeutung der Leukozyten bei der Abtötung der Bakterien wurde die Leukozytenkonzentration nach jeder Blutentnahme mit Hilfe eines Coulter-Counters bestimmt. Außerdem wurde das Verhältnis zwischen Leukozyten- und Keimkonzentration zu Versuchsbeginn errechnet $[L_{(o)}] / [K_{(o)}]$. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 graphisch dargestellt.

Unter dem Einfluß des Blutes ohne Ampicillin zeigt sich bei E. coli C. 10 eine Wachstumshemmung über den gesamten Zeitraum, während bei E. coli 837 bis zur Stunde 4 eine Bakterizidiephase vorliegt, in der eine Keimzahlreduktion unter die Nachweisgrenze von 0,08 % der Anfangskonzentration erfolgt. Bis zur Stunde 6 steigt hier die Keimzahl wieder auf 0,92 % an. Der Stamm E. coli 1189 wächst nach einer kurzen initialen Latenzphase aus.

Der Einfluß des Antibiotikums führt bei allen drei Stämmen sehr schnell zu einer Keimzahlreduktion. Beim Stamm C 10 sinkt die Anzahl der Keime binnen 1,25 Stunden unter 0,1 % der Anfangskonzentration ab, beim Stamm 837 geschieht das gleiche bis zur Stunde 2 und beim Stamm 1189 bis zur Stunde 2,5.

Die Zeit T bis zum Absinken der Keimzahl unter 0,1 % der Ausgangskonzentration zeigt eine negative Korrelation zur Leukozytenkonzentration $[L_{(o)}]$ des jeweils verwendeten Blutes sowie zum oben definierten Quotienten $[L_{(o)}] / [K_{(o)}]$. Dies zeigt Abbildung 10.

Nach Elimination des Ampicillins zur zweiten Versuchsstunde wächst der Stamm C 10, der bereits unter der Nachweisgrenze von 10^2 Keimen/ml liegt, nicht mehr aus. Der Stamm 837 kann sich zwischen Stunde 2 und 4 zwar leicht erholen, wird dann jedoch stark reduziert und liegt zur Stunde 6 unter der Nachweisgrenze. Anders verhält sich der Stamm 1189. Seine Konzentration beträgt zur Stunde 2 noch $2{,}7 \times 10^3$ Keime/ml. Er erholt sich und wächst nach einer leichten initialen Verzögerung gegenüber AB-freiem Wachstum wieder aus. Seine Konzentration zur Stunde 6 beträgt nahezu 10^7 Keime/ml.

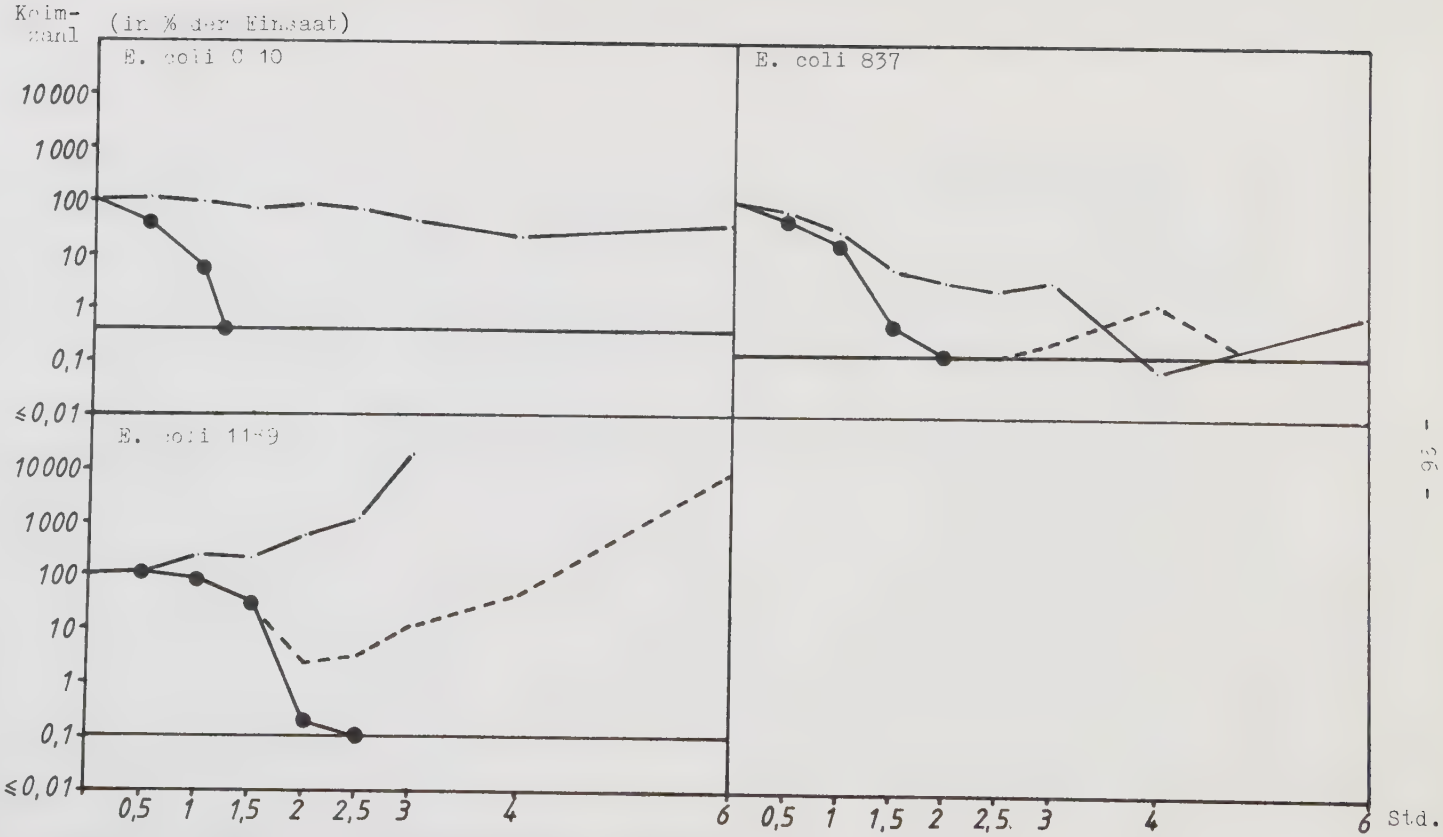


Abb. 9: Wirkung von 1/2 MHK Ampicillin auf Escherichia coli in Vollblut

100 % ≙ Bakterieneinsaat

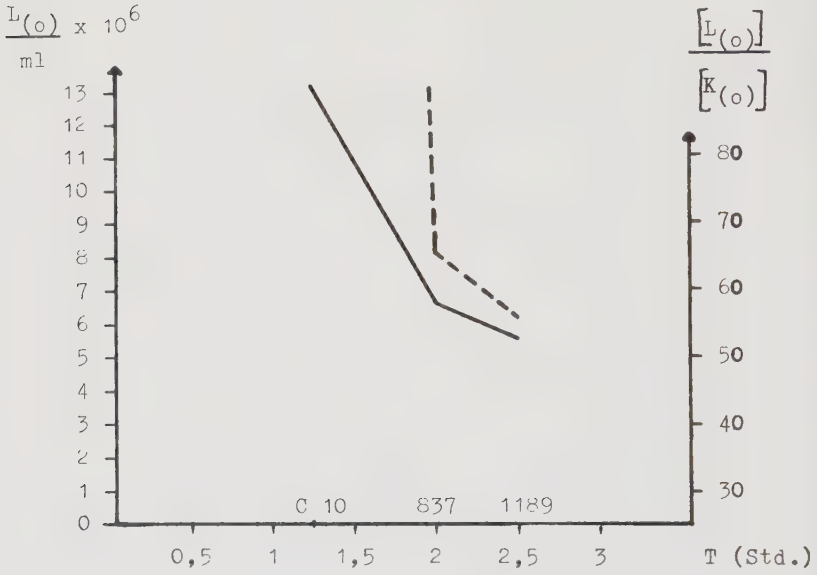
mit Antibiotikum — ohne Antibiotikum

nach Antibiotikumelimination zur Stunde 2

Tabelle 5: Wirkung von 1/2 MHK Ampicillin gegenüber Escherichia coli in Vollblut

Stamm	Ampicillin-Konzentration (µg/ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
	0	3×10^4	110	90	70	83	67	43	22	37
C 10	1 (bis Std.2)	$2{,}8 \times 10^4$	—	—	—	—	<0,36	<0,36	<0,36	<0,36
	1	$2{,}8 \times 10^4$	39	5,4	<0,36	<0,36	<0,36	<0,36	<0,36	<0,36
	0	$1{,}3 \times 10^5$	68	28	5,5	3,2	2,3	3,3	0,077	0,92
837	64(bis Std.2)	8×10^4	—	—	—	—	0,13	0,25	1,4	<0,13
	64	8×10^4	43	15	0,5	0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13
	0	$1{,}3 \times 10^5$	115	223	208	538	1154	19231		
1189	0,5(bis Std.2)	$1{,}2 \times 10^5$	92	68	23	2,25	3	11,7	41,7	7583
	0,5	10^5	120	84	30	0,2	0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Abb. 10: Einfluß der Leukozyten auf die Geschwindigkeit der Keimzahlreduktion unter Ampicillin-einwirkung



T: Zeit bis zum Absinken der Keimzahl unter 0,1 % der Ausgangskonzentration

$[L_{(o)}]$: Leukozytenkonzentration

$[K_{(o)}]$: Keimkonzentration

——— Korrelation zwischen $\frac{L_{(o)}}{ml}$ x 10^6 und T

- - - - - - - Korrelation zwischen $\frac{[L_{(o)}]}{[K_{(o)}]}$ und T

III.6. Mezlocillin gegenüber Escherichia coli in Vollblut

Die Wirkung von 1/2 MHK Mezlocillin auf E. coli in Vollblut wurde mit den Stämmen C 10, 837, 1190 und 1189 untersucht. Abbildung 11 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse.

Ohne Mezlocillin bewirkt das Blut beim Stamm E. coli C 10 zunächst eine geringfügige Keimzahlreduktion. Ab Stunde 2 wachsen die Keime langsam wieder aus. Ähnlich verhält sich E. coli 1190, jedoch erfolgt hier die initiale Bakterizidie heftiger. Auch die beiden Stämme E. coli 837 und 1189 zeigen eine initiale Bakterizidiephase, an die sich bei 1189 ein sehr langsames Wachstum ab Stunde 3 und bei 837 eine Wachstumshemmung bis zur Stunde 6 anschließt.

Unter Mezlocillineinfluß erfolgt bei allen vier Stämmen eine rasche Bakterizidie. Die Reduktion der Keimzahl auf 0,1 % der Ausgangskonzentration wird bei den Stämmen C 10 und 837 nach zwei Stunden erreicht. Beim Stamm 1189 dauert es 1,5 Stunden und der Stamm 1190 ist bereits nach einer Stunde bis auf 0,1 % eliminiert worden. Diese Zeit T weist keine eindeutige Korrelation zur Leukozytenkonzentration auf, wie Abb. 12 zeigt.

Auch bei den im folgenden beschriebenen Untersuchungen zeigte sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Leukozytenkonzentration und Bakterizidie. Deshalb wird dort auf entsprechende Darstellungen verzichtet.

Die nach zwei Stunden vorgenommene Mezlocillin-Elimination bewirkt bei keinem der vier Stämme ein Wiederauswachsen. Beim Stamm 837 verzögert sich der Keimzahlrückgang bis unter die Nachweisgrenze

um 1 - 1,5 Stunden, während der Stamm C 10 ebenso wie unter andauernder Mezlocillinwirkung reduziert wird und zwischen Versuchsstunde 3 und 4 unter die Nachweisgrenze absinkt. Von den Stämmen 1190 und 1189, die bereits vor dem Zeitpunkt der Elimination des Antibiotikums unter der Nachweisgrenze lagen , konnten auch bis zum Versuchsende zur Stunde 6 keine Keime mehr nachgewiesen werden.

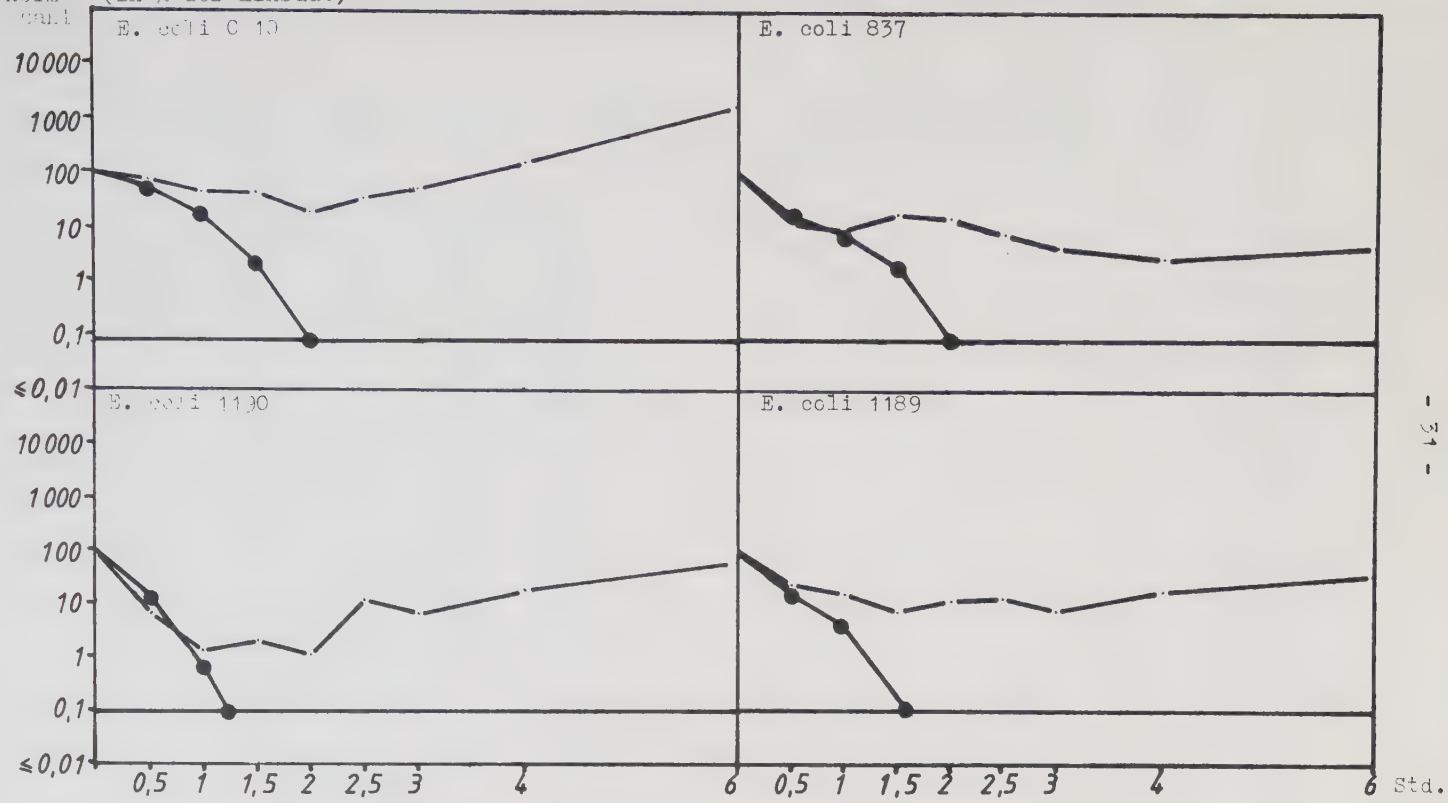


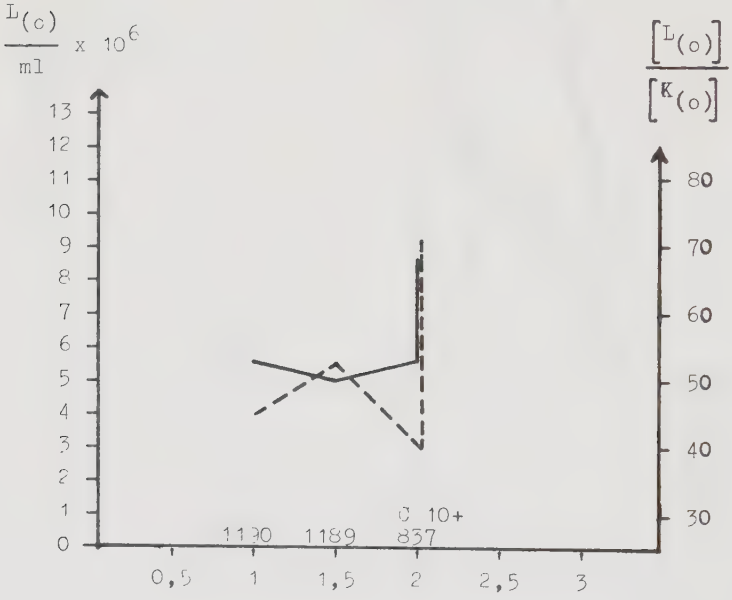
Abb.11: Wirkung von 1/2 MHK Mezlocillin auf Escherichia coli in Vollblut

100 % ≙ Bakterieneinsaat

mit Antibiotikum —·—·→— ohne Antibiotikum

– – – – – – – – nach Antibiotikumelimination zur Stunde 2

Abb. 12: Einfluß der Leukozyten auf die Geschwindigkeit der Keimzahlreduktion unter Mezlocillin-einwirkung



T: Zeit bis zum Absinken der Keimzahl unter 0,1 % der Ausgangskonzentration

$[L_{(o)}]$: Leukozytenkonzentration

$[K_{(o)}]$: Keimkonzentration

——————— Korrelation zwischen $\frac{L_{(o)}}{ml} \times 10^6$ und T

– – – – – – – Korrelation zwischen $\frac{[L_{(o)}]}{[K_{(o)}]}$ und T

Tabelle 6: Wirkung von 1/2 MHK Mezlocillin gegenüber Escherichia coli in Vollblut

Stamm	Mezlocillin-Konzentration (μg/ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
	0	$1,1 \times 10^5$	72,7	42,7	45,5	19,1	34,5	52,7	154,5	18182
C 10	1 (bis Std.2)	$1,3 \times 10^5$	—	—	—	—	0,077	0,077	<0,077	<0,077
	1	$1,3 \times 10^5$	58	16	2,1	0,077	0,077	0,077	<0,077	<0,077
	0	$1,5 \times 10^5$	12	9,3	19,3	15,3	8	4,7	2,9	5,1
837	32(bis Std.2)	$1,2 \times 10^5$	—	—	—	—	0.083	0,083	<0,083	<0,083
	32	$1,2 \times 10^5$	15	7,7	1,9	0,083	<0,083	<0,083	<0,083	<0,083
	0	$1,5 \times 10^5$	6	1,2	2	1,1	11,3	6,3	18	60
1190	1 (bis Std.2)	$1,1 \times 10^5$	—	—	—	—	<0,091	<0,091	<0,091	<0,091
	1	$1,1 \times 10^5$	13	0,64	<0,091	<0,091	<0,091	<0,091	<0,091	<0,091
	0	$9,3 \times 10^4$	23,7	15,1	7,6	10,8	11,8	7,6	17,2	35,5
1189	1 (bis Std.2)	$9,8 \times 10^4$	—	—	—	—	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	1	$9,8 \times 10^4$	16	4,0	0,2	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

III.7. Ampicillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Vollblut

Die Klebsiella pneumoniae Stämme 4786, 4601, 6126 und 5343 wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber subinhibitorischen Konzentrationen von Ampicillin in Vollblut untersucht. Analog zum Versuch III.3. betrug die Ampicillin-Konzentration für die sensiblen Stämme 4786, 4601 und 6126 1/2 MHK, für den resistenten Stamm 5343 (MHK >256 µg/ml) 32 µg/ml. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 aufgezeichnet.

Ohne Antibiotikum zeigen die Keime K. pneumoniae 4786 und 4601 eine deutliche initiale Bakterizidiephase. Nach einem Keimzahlrückgang auf 6,9 % der Anfangskonzentration zur Stunde 1,5 bei K. pneumoniae 4786 bzw. auf 27,8 % zur Stunde 1 bei K. pneumoniae 4601 wachsen beide Stämme wieder aus. Auch bei K. pneumoniae 5343 sinkt die Keimzahl bis zur Stunde 2 auf 31,5 % der Anfangskonzentration. Hieran schließt sich eine einstündige Latenzphase an, bis die Keime zur Stunde 3 wieder auswachsen. Beim Stamm 6126 kommt es zu einer initialen Wachstumshemmung bis zur Stunde 1,5. Danach wachsen auch hier die Keime wieder aus.

Unter der Wirkung des Antibiotikums wird die Keimzahl der drei Ampicillin-sensiblen Stämme schnell reduziert. Auf 0,1 % der Anfangskonzentration sinkt die Keimzahl bei K. pneumoniae 4786 nach 2,5 Stunden, bei den Stämmen 4601 und 6126 nach ungefähr zwei Stunden. Bis zum Versuchsende zur Stunde 6 kann der Stamm 4786 sich bei einer Konzentration von 10^2 Keimen/ml halten. Demgegenüber sind die beiden Stämme 4601 und 6126 ab der Stunde 2,5 nicht mehr nachweisbar. Der resistente Stamm 5343 reagiert mit einem leichten Keimzahlrückgang bis zur Stunde 3. Dann folgt ein langsames Wachstum, so daß zur Versuchsstunde 6 die

Anfangskonzentration nahezu wieder erreicht ist. Es liegt also -über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet- eine Wachstumshemmung vor.

Im Gegensatz zu Versuch III.3. zeigt der Stamm 5343 mit und ohne Ampicillin einen unterschiedlichen Verlauf. Nach einem ähnlichen Verlauf bis zur Stunde 3 wächst die Ampicillin-freie Probe rascher aus und erreicht bis zur Stunde 6 die 50-fache Konzentration der Probe mit Ampicillin.

Die Ampicillinelimination zur zweiten Versuchsstunde beschleunigt das Wachstum des Stammes 5343 geringfügig gegenüber der Ampicillin-haltigen Probe.

Bei keinem der vier Stämme kommt es zu einer Fortsetzung des Keimzahlrückganges nach Ampicillinelimination zur Stunde 2. Beim Stamm 6126 kommt es zwar nicht zu einem Wachstum, jedoch bleibt die Keimzahl bis zur Stunde 6 etwa konstant. Demgegenüber wachsen die Stämme 4786 und 4601 wieder aus. Ein Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten (mit Hilfe der Zeit T, in der sich -gemessen ab Stunde 2- die Keimzahl verzehnfacht) zeigt bei diesen beiden Stämmen und beim Stamm 5343 eine deutliche Verzögerung gegenüber den Ampicillin-freien Proben. Dies zeigt die Abbildung 14.

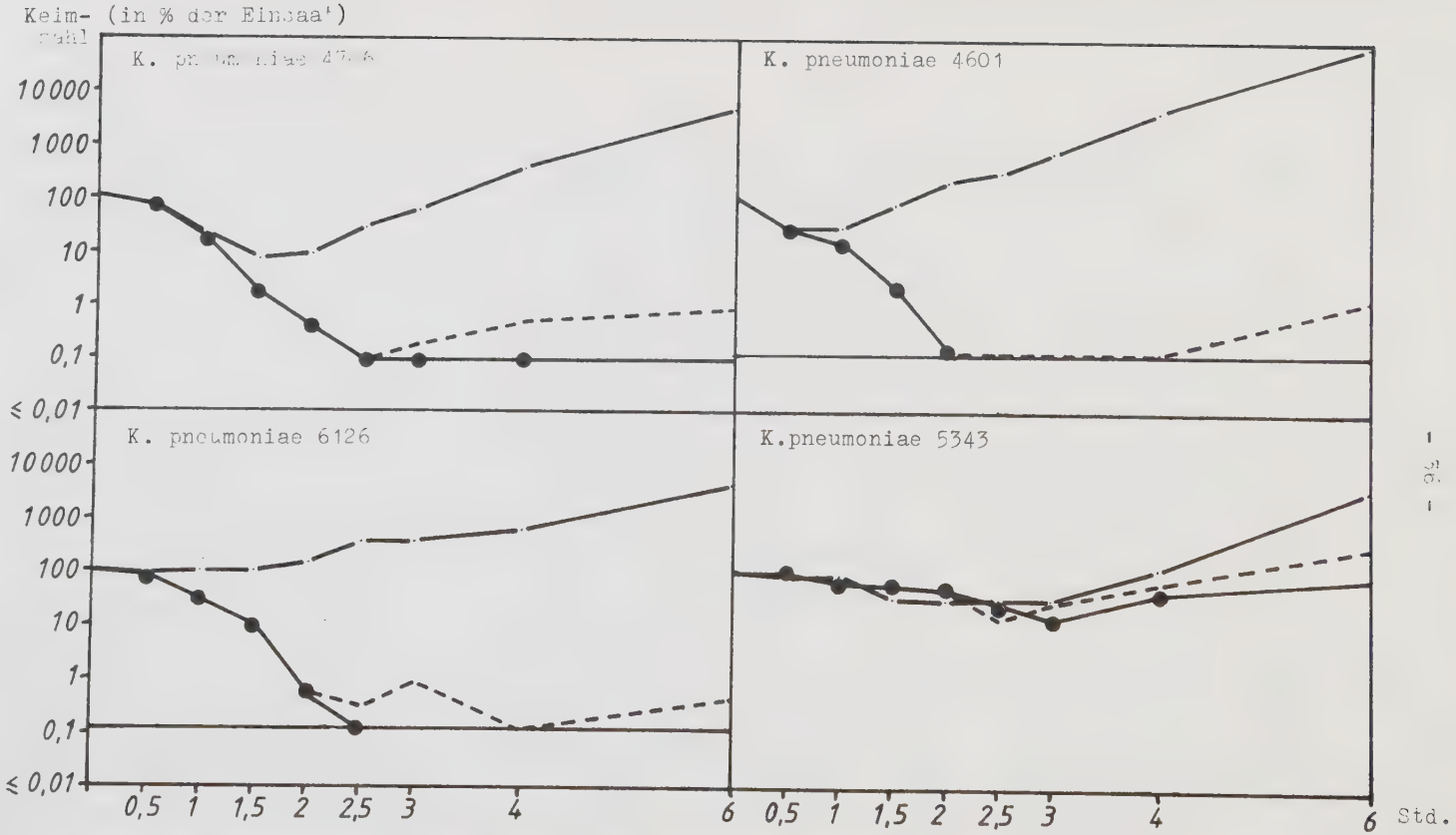


Abb. 13: Wirkung von 1/2 MHK Ampicillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Vollblut

100 % ≙ Bakterieneinsaat

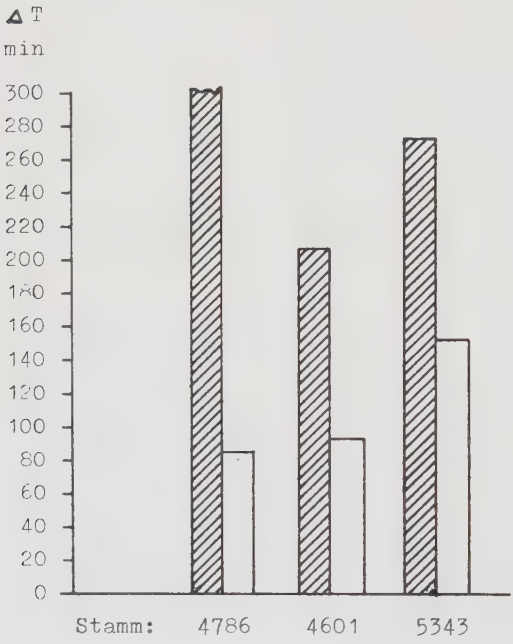
mit Antibiotikum — ohne Antibiotikum

nach Antibiotikumelimination zur Stunde 2

Tabelle 7: Wirkung von 1/2 MHK Ampicillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Vollblut (MHK von K. pneumoniae 5343 >256 µg/ml)

Stamm	Ampicillin-Konzentration (µg/ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
	0	$9,7 \times 10^4$	63,9	20,6	6,9	8	28,9	59,8	350,5	4948
4786	32(bis Std.2)	$1,1 \times 10^5$	—	—	—	—	0,091	0,18	0,45	0,82
	32	$1,1 \times 10^5$	69	18	1,8	0,36	0,091	0,091	0,091	0,091
	0	$9,7 \times 10^4$	28,9	27,8	75,3	206,2	309,3	773,2	4639	82474
4601	32(bis Std.2)	8×10^4	—	—	—	—	0,13	0,13	0,13	1,9
	32	8×10^4	26	14	2,1	0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13
	0	10^5	79	99	99	130	360	360	590	4000
6126	32(bis Std.2)	$9,5 \times 10^4$	—	—	—	—	0,32	0,84	0,11	0,42
	32	$9,5 \times 10^4$	85	28	9,4	0,53	<0,11	<0,11	<0,11	<0,11
	0	$8,9 \times 10^4$	84,3	89,9	33,7	31,5	33,7	33,7	123,6	3820
5343	32(bis Std.2)	$8,5 \times 10^4$	—	—	—	—	14,1	28,2	64,7	329,4
	32	$8,5 \times 10^4$	94	62	54	48	26	13	41	82

Abb. 14: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit von Klebsiella pneumoniae in Vollblut mit und ohne antibiotische Vorschädigung durch Ampicillin



ΔT: Zeitraum, in dem sich die Keimzahl, gemessen ab Versuchsstunde 2, um eine Zehnerpotenz erhöht

▨: Seit zwei Stunden durch Ampicillin vorgeschädigte Keime

□: nicht antibiotisch vorgeschädigte Keime

III.8. Mezlocillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Vollblut

Untersucht wurde die Wirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Mezlocillin auf vier Stämme von K. pneumoniae in Vollblut. Die Mezlocillinkonzentration betrug für die sensiblen Stämme 4786, 4601 und 6126 1/2 MHK. Der resistente Stamm 5343 (MHK > 256 µg/ml) wurde einer Konzentration von 32 µg/ml - analog zum Versuch III.4. - ausgesetzt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt Abbildung 15.

Das Wachstumsverhalten der Keime in Vollblut ist ohne den Einfluß von Mezlocillin recht unterschiedlich. So wächst der Stamm 4786 erst nach einer initialen Bakterizidiephase mit einer Keimzahlreduktion auf 28 % der Anfangskonzentration zur Stunde 1,5 wieder aus. Auch beim Stamm 5343 findet nach einer initialen Latenzphase ein Keimwachstum statt. Demgegenüber zeigt sich bei den Stämmen 4601 und 6126 eine starke Bakterizidiephase. Diese hält bei 6126 über den gesamten Versuchszeitraum an und reduziert bis zur Stunde 6 die Keimzahl auf 0,8 % der Anfangskonzentration. Bei 4601 erfolgt eine Keimzahlreduktion auf 0,12 % bis zur Stunde 3, an die sich nach einer einstündigen Latenzphase eine leichte Keimzahlzunahme anschließt.

Unter dem Einfluß von Mezlocillin kommt es bei allen vier Stämmen -einschließlich des resistenten Stammes 5343- zu einer raschen Abtötung der Keime. Die Zeit bis zur Reduktion der Keimzahl auf 0,1 % der Anfangskonzentration beträgt bei K. pneumoniae 4786 und 4601 zwei Stunden, bei K. pneumoniae 6126 und 5343 2,5 Stunden. Jeweils 30 Minuten später können -mit Ausnahme beim Stamm 5343- keine Keime mehr nachgewiesen

werden. Der Stamm 5343 zeigt nach einer Wachstumshemmung zwischen der zweiten und vierten Stunde einen leichten Keimzahlanstieg bis zur Stunde 6.

Nach der Mezlocillin-Elimination zur zweiten Stunde wächst keiner der drei Stämme , die Mezlocillin-sensibel sind, während des Beobachtungszeitraumes wieder aus. Beim Stamm 4601 zeigt sich kein Unterschied zu der Mezlocillin-haltigen Probe, während sich das Absinken der Keimzahl unter die Nachweisgrenze beim Stamm 4786 um etwa zwei Stunden, beim Stamm 6126 um ungefähr 1,5 Stunden verzögert. Der resistente Stamm 5343 zeigt ein leichtes Wachstum bis zur Stunde 4. Ein bemerkenswerter Unterschied gegenüber den Proben mit Mezlocillin liegt also hier nicht vor.

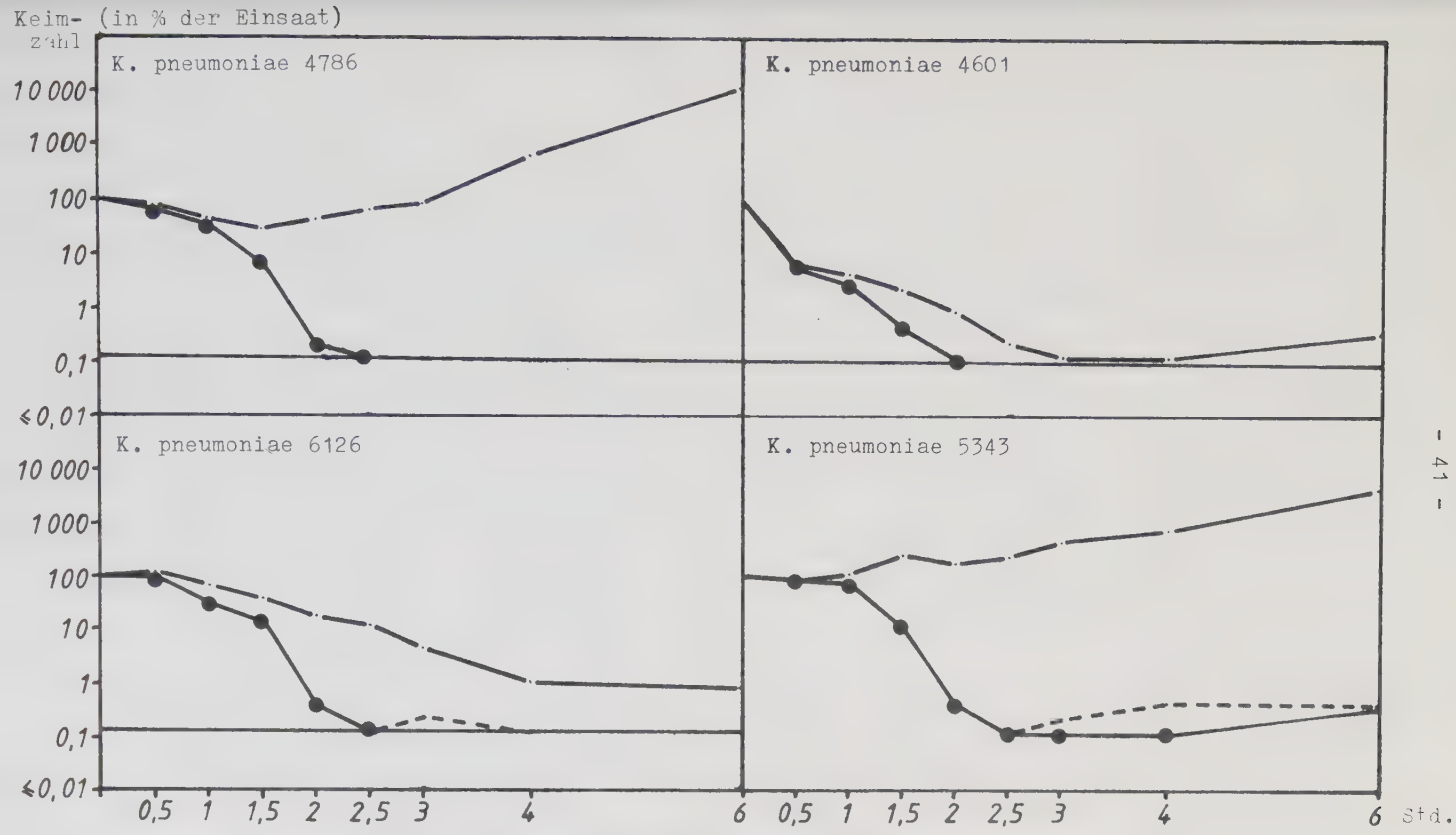


Abb. 15: Wirkung von 1/2 MHK von Mezlocillin gegenüber K. pneumoniae in Vollblut

100 % ≙ Bakterieneinsaat

mit Antibiotikum — ohne Antibiotikum

nach Antibiotikumelimination zur Stunde 2

Tabelle 8: Wirkung von 1/2 MHK Mezlocillin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Vollblut (MHK von K. pneumoniae 5343 > 256 µg/ml)

Stamm	Mezlocillin-Konzentration (µg/ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
	0	10^5	78	43	28	40	64	86	620	12000
4786	8 (bis Std.2)	$9,4 \times 10^4$	—	—	—	—	0,11	0,11	0,11	<0,11
	8	$9,4 \times 10^4$	61	33	6,7	0,21	<0,11	<0,11	<0,11	<0,11
	0	$8,6 \times 10^4$	6,7	4,1	2,3	0,93	0,23	0,12	0,12	0,35
4601	8 (bis Std.2)	$8,8 \times 10^4$	—	—	—	—	<0,11	<0,11	<0,11	<0,11
	8	$8,8 \times 10^4$	5,6	2,7	0,45	0,11	<0,11	<0,11	<0,11	<0,11
	0	$8,7 \times 10^4$	109	65,5	39,1	17,2	11,5	4,4	1,0	0,8
6126	8 (bis Std.2)	$8,3 \times 10^4$	—	—	—	—	0,12	0,24	0,12	<0,12
	8	$8,3 \times 10^4$	90	30	13	0,36	0,12	<0,12	<0,12	<0,12
	0	10^5	81	110	250	190	240	470	780	4700
5343	32(bis Std.2)	$9,2 \times 10^4$	—	—	—	—	0,11	0,22	0,43	0,33
	32	$9,2 \times 10^4$	82	75	11	0,43	0,11	0,11	0,11	0,43

III.9. Escherichia coli und Klebsiella pneumoniae in Vollblut nach Vorschädigung durch Mezlocillin

In diesem Versuch wurden die Keime für zwei Stunden in MHB mit 1/2 MHK Mezlocillin vorbebrütet. Dann wurden diese Keime nach Elimination des Antibiotikums in Vollblut überimpft und für weitere sechs Stunden bebrütet. Der Versuch erfolgte mit den Stämmen E. coli 837, E. coli 1189, K. pneumoniae 6126 und K. pneumoniae 4601. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse.

Der Stamm E. coli 837 zeigt innerhalb der ersten 30 Minuten eine Keimzahlreduktion auf 25 % der Anfangskonzentration. Hier liegt aufgrund der geringen Einsaat bereits die Nachweisgrenze, so daß ein weiteres Absinken der Keimzahl nicht mehr meßbar ist. Bis zur dritten Stunde bleibt die Keimzahl unter der Nachweisgrenze; zur vierten weist sie einen Anstieg auf 50 % auf, sinkt jedoch bis zur sechsten wieder unter die Nachweisgrenze ab. Beim Stamm E. coli 1189 sinkt die Keimzahl während der ersten 30 Minuten unter die Nachweisgrenze von 6,7 % ab. Nach 2,5 Stunden wächst der Stamm wieder aus und erreicht innerhalb von etwa 50 Minuten einen Keimzahlanstieg um eine Zehnerpotenz. Die beiden K. pneumoniae-Stämme verhalten sich ähnlich wie E. coli. Der Stamm 6126 sinkt binnen 30 Minuten nach Versuchsbeginn auf 3,2 % der Ausgangskonzentration. Bis zum Versuchsende zeigt sich eine Wachstumshemmung auf diesem Niveau. Demgegenüber wächst der Stamm 4601 nach einer initialen Keimzahlreduktion auf 30 % der Anfangskonzentration zur Stunde 1,5 wieder aus. Die Keimkonzentration erhöht sich innerhalb von 90 Minuten um eine Zehnerpotenz.

Wie auch in den vorangegangenen Versuchen zeigt sich keine Korrelation zwischen der Leukozytenkonzentration und dem Wachstumsverhalten der Keime.

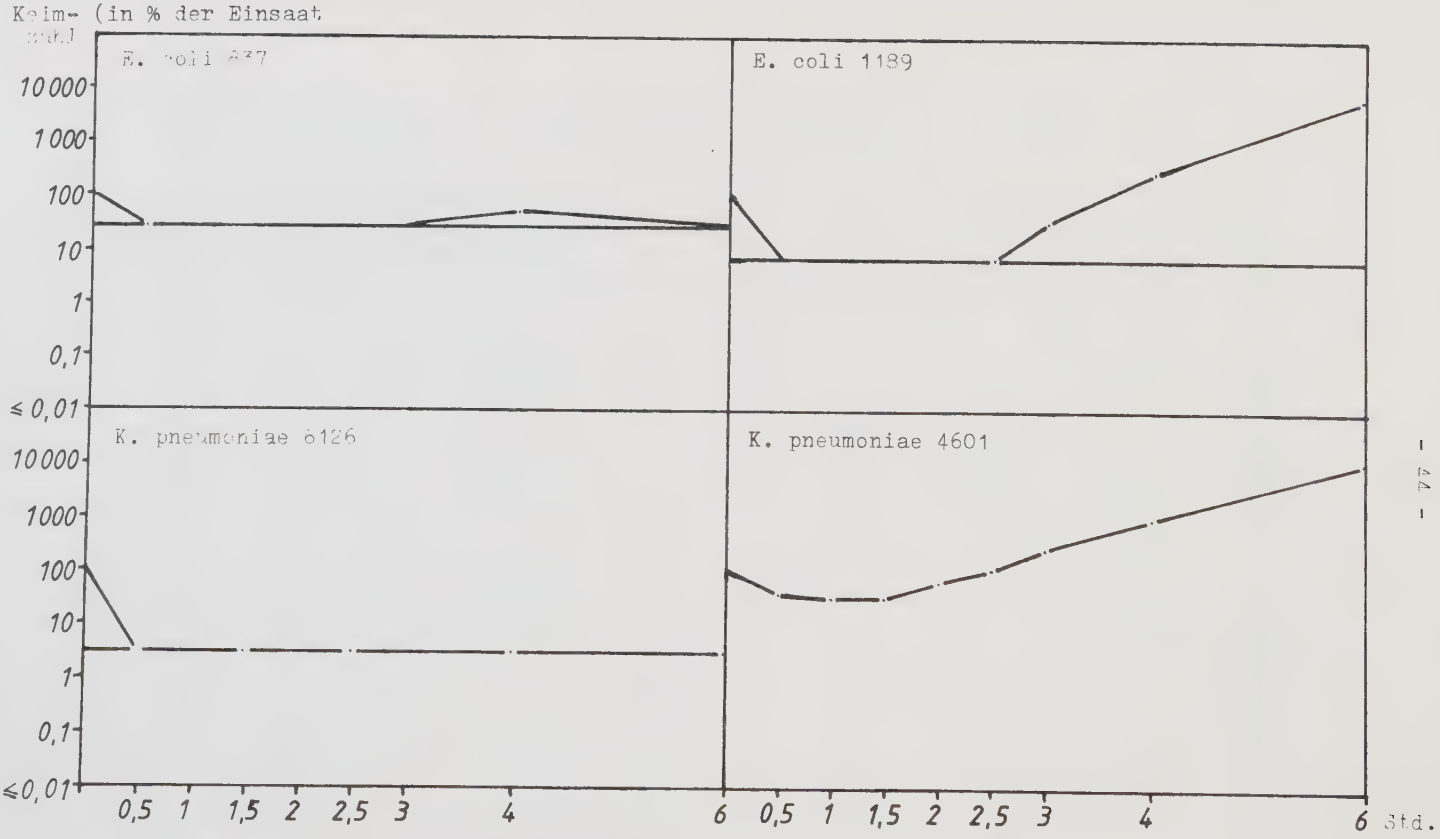


Abb. 16: Wachstumsverhalten von Escherichia coli und Klebsiella pneumoniae in Vollblut nach zweistündiger Vorschädigung durch 1/2 MHK Mezlocillin

100 % ≙ Bakterieneinsaat

Tabelle 9: Wachstumsverhalten von Escherichia coli und Klebsiella pneumoniae in Vollblut nach zweistündiger Vorschädigung durch 1/2 MHK Mezlocillin

Stamm	Mezlocillin-Konzentration (μg/ml)	Einsaat in Vollblut nach Mez.-Vorschädig.	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
E. coli 837	32	4×10^2	<25	25	<25	<25	<25	<25	50	<25
E. coli 1189	1	$1,5 \times 10^3$	<6,7	<6,7	<6,7	<6,7	6,7	33,5	300	7300
K. pneum. 6126	8	$3,1 \times 10^3$	3,2	<3,2	3,2	<3,2	3,2	<3,2	3,2	3,2
K. pneum. 4601	8	$2,5 \times 10^4$	40	32,8	33,6	68	112	268	1040	12000

III.10. Wirkung verschiedener Blutbestandteile auf Escherichia coli unter initialem Einfluß von 1/2 MHK Mezlocillin

Zur Untersuchung der antibakteriellen Wirkung verschiedener Blutbestandteile wurden die beiden Stämme E. coli 837 und E. coli 1189 in die folgenden drei Ansätze überimpft und bebrütet:

Ansatz I: Frisches, aktives Plasma mit $7,5 \times 10^6$ Leukozyten pro ml

Ansatz II: Inaktives Plasma mit $7,5 \times 10^6$ Leukozyten pro ml

Ansatz III: Vollblut mit einer auf $1,2 \times 10^6$ pro ml reduzierten Leukozytenzahl

In allen drei Ansätzen war 1/2 MHK Mezlocillin vorhanden. Dieses wurde nach zwei Versuchsstunden eliminiert. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 17.

Beim Stamm E. coli 837 kommt es in den Ansätzen I und III zu einer sofort einsetzenden Abtötung der Keime. Diese führt bis zur Stunde 2 im Ansatz III zu einem Keimzahlrückgang unter 0,1 %, im Ansatz I auf 1,3 % der Anfangskonzentration. Im Ansatz II ist während der ersten Versuchsstunde lediglich eine Wachstumshemmung zu verzeichnen, an die sich eine Keimzahlabnahme auf 5,1 % bis zur Stunde 2 anschließt. Nach Elimination des Mezlocillins wachsen hier die Keime sofort wieder aus und verzehnfachen sich in weniger als 60 Minuten. Auch die Keime im Ansatz III erholen sich wieder, nachdem sie zwischen Stunde 2 und 4 unter der Nachweisgrenze lagen. Sie benötigen, gemessen ab Versuchsstunde 2, 3 3/4 Stunden zum Keimzahlanstieg um eine Zehnerpotenz. Im Ansatz I kommt es nach der Mezlocillin-Elimination lediglich zu einer geringfügigen Bakterizidie bis auf

0,15 % der Anfangskonzentration zur Stunde 6.

Beim Stamm E. coli 1189 zeigt sich ein ähnliches Ergebnis. So findet sich auch hier im Ansatz II eine einstündige initiale Latenzphase und ein sofortiges Wachstum nach Mezlocillin-Elimination. Die Anfangsbakterizidie in den beiden anderen Ansätzen erfolgt rascher als bei E. coli 837, wobei auch im Ansatz I die Keimzahl unter die Nachweisgrenze absinkt und diese bis zum Versuchsende -ebenso wie im Ansatz III- nicht mehr erreicht wird.

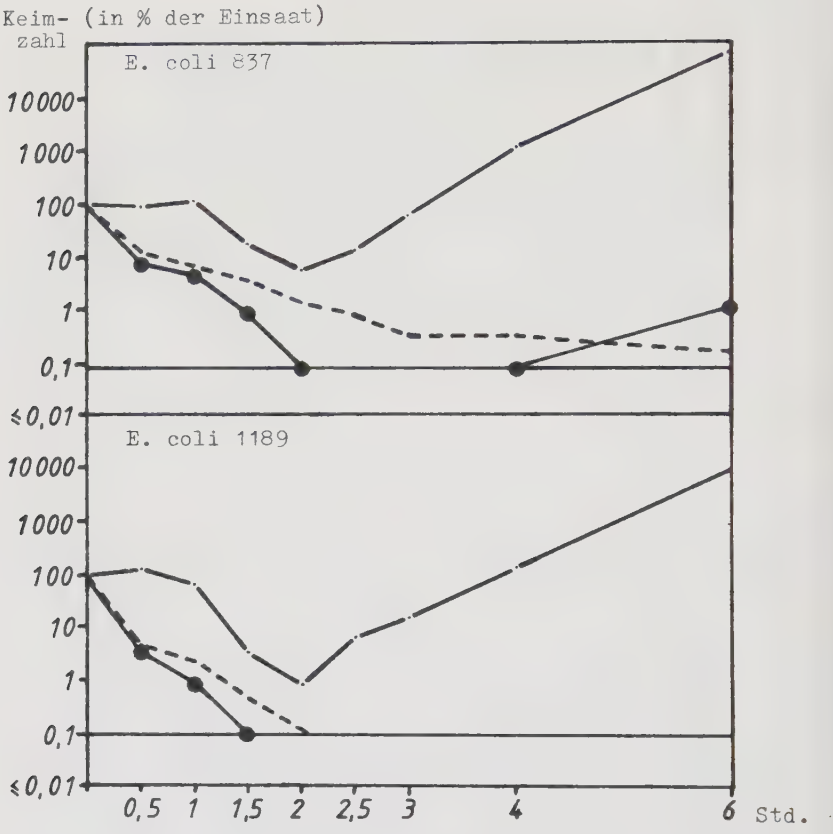


Abb. 17: Wachstumsverhalten von Escherichia coli unter dem Einfluß verschiedener Blutbestandteile bei initialer Behandlung mit 1/2 MHK Mezlocillin

100 % ≙ Bakterieneinsaat

- - - - - - - - - - aktives Plasma + Leukozyten

—·—·—·—·— inaktives Plasma + Leukozyten

●—●—●—● Leukozytenreduziertes Vollblut

Tabelle 10: Wachstumsverhalten von Escherichia coli unter dem Einfluß verschiedener Blutbestandteile bei initialer Behandlung mit 1/2 MHK Mezlocillin

Stamm	Mezloc.-Konzentr. (µg/ml)	Ansatz	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
E. coli 837	32	A[1]	$1,3 \times 10^5$	11,54	6,38	3,46	1,31	0,85	0,31	0,31	0,15
E. coli 837	32	B[2]	$1,5 \times 10^5$	86,67	106,67	17,33	5,13	12,67	59,33	1066,7	66666,7
E. coli 837	32	C[3]	$1,3 \times 10^5$	7,46	4,46	0,85	<0,077	<0,077	<0,077	0,077	1,08
E. coli 1189	1	A	$9,1 \times 10^4$	4,73	2,20	0,44	0,11	<0,11	<0,11	<0,11	<0,11
E. coli 1189	1	B	$1,3 \times 10^5$	123,08	66,92	3,15	0,85	6,38	15,38	123,08	92308
E. coli 1189	1	C	$1,2 \times 10^5$	3,5	0,92	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08

1) aktives Plasma + Leukozyten 2) inaktives Plasma + Leukozyten 3) leukozytenreduziertes Vollblut

III.11. Mezlocillin gegenüber Escherichia coli in aktivem und inaktivem Plasma

Untersucht wurde die Wirkung von 1/2 MHK Mezlocillin auf zwei Stämme von E. coli. Im aktiven Plasma setzt bei E. coli 1189 sofort eine Bakterizidie ein, unter der die Keimkonzentration bis zur Stunde 2 unter die Nachweisgrenze von 0,2 % der Anfangskonzentration absinkt. Bei E. coli 837 sinkt die Keimzahl bereits nach 1,5 Stunden unter die Nachweisgrenze von 0,29 % ab, nachdem sie eine initiale Latenzphase von etwa 1/2 Stunde durchlaufen hat. Bis zum Versuchsende sind bei beiden Stämmen keine Keime mehr nachweisbar. Auch nach der Elimination des Antibiotikums zur zweiten Stunde kann der Stamm E. coli 837 sich bis zum Versuchsende zur Stunde 6 nicht wieder erholen, während E. coli 1189 zur vierten Stunde wieder auswächst und bis zur Stunde 6 0,39% der Anfangskonzentration erreicht.

Im inaktiven Plasma zeigt E. coli 1189 nach einer 1/2-stündigen initialen Latenzphase eine langsame Keimzahlabnahme bis auf 4,3 % der Anfangskonzentration. Nach der vierten Stunde kommt es zu einer leichten Erholung mit einem Keimzahlanstieg auf 6,5 % zur Stunde 6. Bei E. coli 837 zeigt sich ein ähnlicher Verlauf. Hier sieht man eine initiale Latenzphase über mehr als zwei Stunden, an die sich eine Phase der Bakterizidie anschließt, die zur vierten Stunde bei 6,5 % der Anfangskonzentration endet. Ebenso wie bei E. coli 1189 erfolgt hier bis zur Stunde 6 ein leichtes Wachstum auf 13,8 %.

Bei beiden Stämmen führt die Elimination des Antibiotikums zur Stunde 2 mit einer 1/2-stündigen Verzögerung zum Wiederauswachsen der Keime. Bei E. coli 1189 verzehnfacht sich die Keimkonzentration, gemessen ab Stunde 2, binnen 1 1/4 Stunden, bei E. coli 837 binnen 2 Stunden. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt.

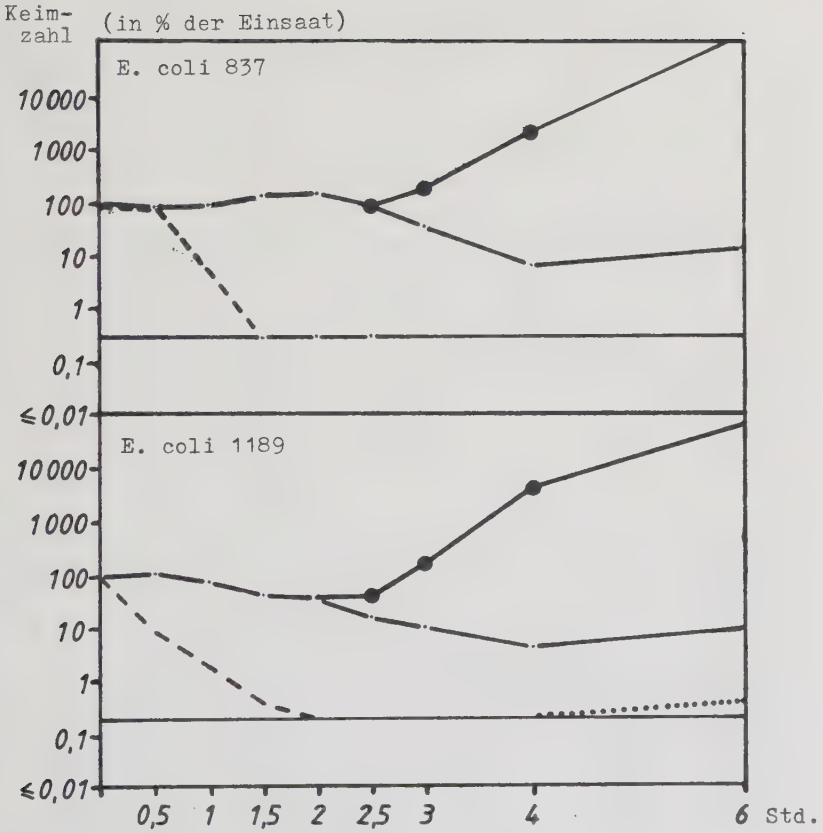


Abb. 18: Wachstumsverhalten von Escherichia coli in aktivem und inaktiviertem Plasma unter Beeinflussung durch 1/2 MHK Mezlocillin

100 % ≙ Bakterieneinsaat

aktives Plasma:
- - - - - - - - - - - vor der Mezlocillin-Elimination
. . . . . nach der Mezlocillin-Elimination

inaktiviertes Plasma:
—·—·—·— vor der Mezlocillin-Elimination
——●——●—— nach der Mezlocillin-Elimination

Tabelle 11: Wachstumsverhalten von Escherichia coli in aktivem und inaktiviertem Plasma unter Beeinflussung durch 1/2 MHK Mezlocillin

Stamm	Mezloc.-Konzentr. (µg/ml)	Medium	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
E. coli 837	32	aktives Plasma	$3,5 \times 10^4$	82,86	5,14	0,29	0,29	0,29	<0,29	<0,29	<0,29
E. coli 837	32	inaktiviertes Plasma	8×10^4	82,5	87,5	137,5	150	87,5	35	6,5	13,75
E. coli 1189	1	aktives Plasma	$5,1 \times 10^4$	8,43	1,96	0,39	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
E. coli 1189	1	inaktiviertes Plasma	$4,7 \times 10^4$	102,13	76,6	40,43	38,30	15,96	10	4,26	9,57
Nach Elimination des Mezlocillins zur Versuchsstunde 2:											
E. coli 837	32	aktives Plasma	----------					<0,29	<0,29	<0,29	<0,29
E. coli 837	32	inaktiviertes Plasma	----------					86,25	175	2000	137500
E. coli 1189	1	aktives Plasma	----------					<0,2	<0,2	<0,2	0,39
E. coli 1189	1	inaktiviertes Plasma	----------					40,43	161,7	4255	61702

III.12. Beeinflussung des Wachstums von E. coli durch Leukozyten in aktivem Plasma

Es wurde das Wachstumsverhalten von drei E. coli Stämmen unter Anwesenheit von Leukozyten untersucht. Die Keime waren weder vor Versuchsbeginn noch während des Versuchs einer antibiotischen Beeinflussung ausgesetzt. Nach den Plasma- und Leukozytenspendern sei der Versuch in drei Gruppen eingeteilt: A, B, C. In der Gruppe A betrug die Leukozytenkonzentration 5×10^6, in der Gruppe B 3×10^7 Leukozyten pro ml; die Gruppe C enthält zwei Proben mit $1{,}5 \times 10^7$ und 3×10^7 Leukozyten pro ml. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 19 und 20 graphisch dargestellt.

Im Vergleich der drei Gruppen zeigt sich, daß der Verlauf der Kurven, die das Keimwachstum in Plasma ohne Leukozyten zeigen, von spenderspezifischen -also plasmaspezifischen- und keimspezifischen Faktoren abhängt. Beim Stamm E. coli 837 ist eine spenderspezifische Komponente kaum erkennbar; die Keime wachsen in den beiden Gruppen A und B mit etwa der gleichen Geschwindigkeit aus, nachdem sie eine initiale Latenzphase durchlaufen haben, die in Gruppe A etwa eine, in Gruppe B etwa zwei Stunden dauert. Beim Stamm 1189 bleibt die Keimzahl bei mäßigen Schwankungen in der Gruppe B -über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet- etwa konstant. Demgegenüber sinkt sie in der Gruppe A bis zur Stunde 3 unter die Nachweisgrenze ab, die sie bis Versuchsende zur Stunde 6 nicht mehr erreicht. Dies deutet auf eine gegenüber E. coli 1189 verstärkte bakterizide Wirkung des Plasmas vom Spender der Gruppe A gegenüber dem der Gruppe B hin. Ebenso scheint das Plasma des Spenders "C" eine stärkere bakterizide Wirkung gegenüber E. coli 837 zu haben als das der Spender "A" und "B". Hier kommt

es nämlich zu einer sofort einsetzenden Bakterizidie, die bis zur dritten Stunde eine Keimzahlreduktion auf 1 % der Anfangskonzentration erreicht. Erst danach setzt ein Wachstum ein, das bis zur sechsten Stunde zu einem Keimzahlanstieg auf 385 % der Anfangskonzentration führt.

Betrachtet man die Kurven der leukozytenhaltigen Proben zusammen mit den Vergleichskurven, so zeigt sich mit einer Ausnahme -bei E. coli 1189 in der Gruppe A-, daß die leukozytenexponierten Keime einer stärkeren Wachstumshemmung bzw. Bakterizidie unterliegen als die leukozytenfreien Keime. Die Intensität dieser antibakteriellen Wirkung steigt mit der Konzentration der Leukozyten an. So führt die Leukozytenkonzentration von 5×10^6/ml in Gruppe A, E. coli 837, lediglich zu einem verlangsamten Wachstum gegenüber der leukozytenfreien Probe. Unter der Konzentration von 3×10^7 Leukozyten pro ml kommt es in der Gruppe B nach einer einstündigen initialen Latenzphase zur Reduktion der Keimzahl, die bei E. coli 837 nach 1,5 Stunden, bei E. coli 1189 nach zwei Stunden unter die Nachweisgrenze absinkt und diese bis zum Versuchsende nicht mehr erreicht. In der Gruppe C, E. coli 837, kommt es unter der Leukozytenkonzentration von 3×10^7 pro ml ebenfalls binnen 1,5 Stunden zur Reduktion der Keimzahl unter die Nachweisgrenze, ohne jedoch eine Plateauphase zu durchlaufen. Unter der Leukozytenkonzentration von $1,5 \times 10^7$ pro ml zeigt die Kurve einen ähnlichen Verlauf, sinkt jedoch mit einer Verzögerung von etwa einer halben Stunde unter die Nachweisgrenze ab. Beim Stamm E. coli 1190 liegt eine geringere Anfälligkeit gegenüber den Leukozyten vor. So sinkt die Keimzahl unter 3×10^7/ml Leukozyten nach Durchlaufen einer Plateauphase zwischen Stunde 0,5 und 1,5 erst zur dritten Stunde unter die Nachweis-

grenze ab. Die Leukozytenkonzentration von 1,5 x 10^7/ml kann ein Auswachsen der Keime ab Stunde 1,5 nicht verhindern. Das Wachstum ist bis zur Stunde 4 gegenüber den leukozytenfreien Keimen verzögert, erfährt jedoch dann eine Beschleunigung und übersteigt deren Keimkonzentration bei etwa 4,5 Stunden.

Bei allen Graphen fällt auf, daß der Kurvenverlauf der leukozytenfreien und leukozytenhaltigen Proben während der ersten 0,5 - 1,5 Stunden nahezu deckungsgleich verläuft. Dies deutet auf einen verzögerten Beginn der Leukozytenwirkung hin.

In der Gruppe A scheinen die Keime des Stammes E. coli 1189 durch die Leukozyten einen Schutz zu erfahren, da die Keimzahl in der leukozytenhaltigen Probe bis zur Versuchsstunde 4 leicht ansteigt, während sie in der leukozytenfreien Probe bereits zur Stunde 3 unter die Nachweisgrenze absinkt.

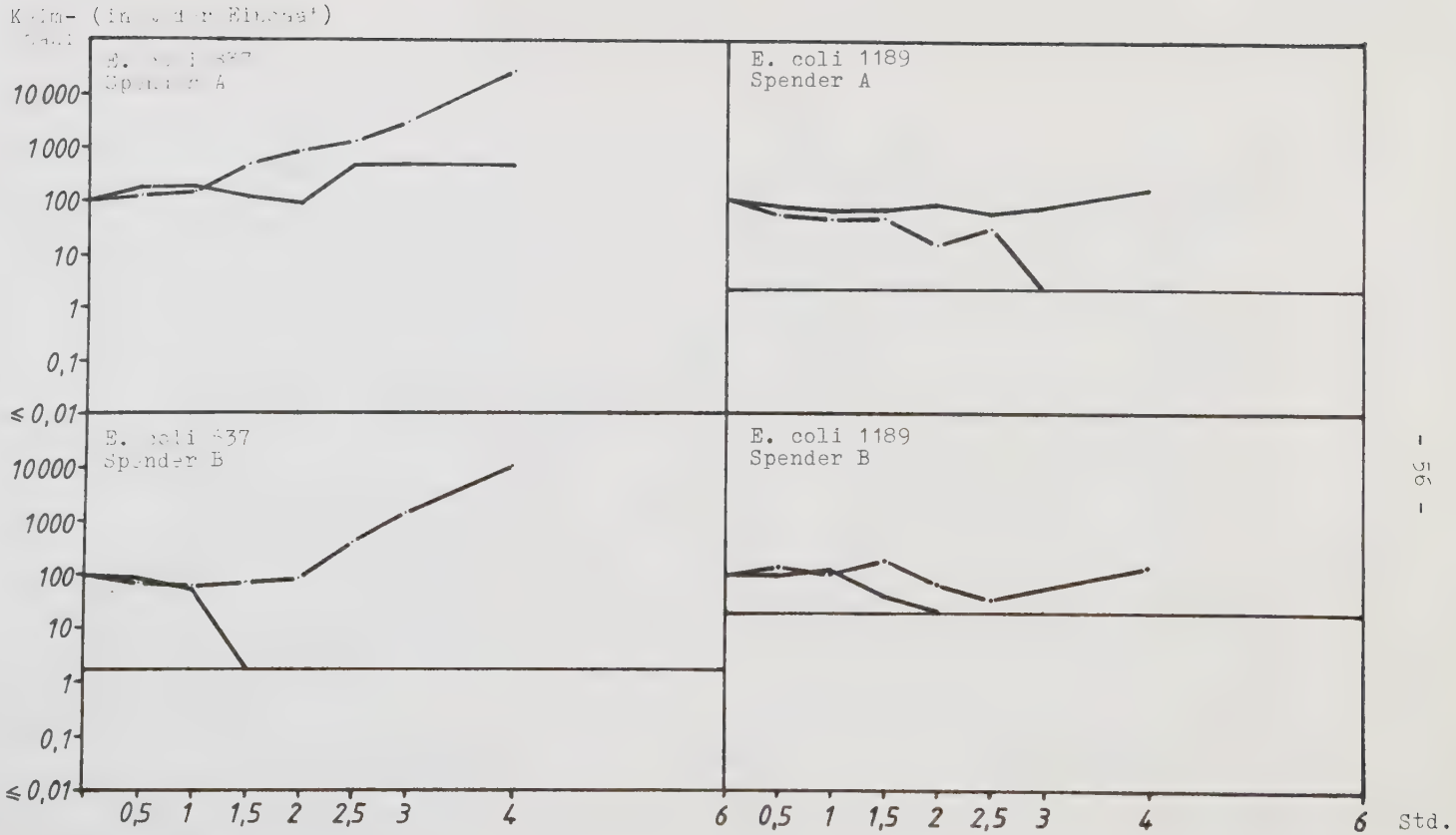


Abb. 1g: Wirkung von Leukozyten auf Escherichia coli in aktivem Blutplasma

100 % ≙ Bakterieneinsaat

——— mit Leukozyten

—·—·— ohne Leukozyten

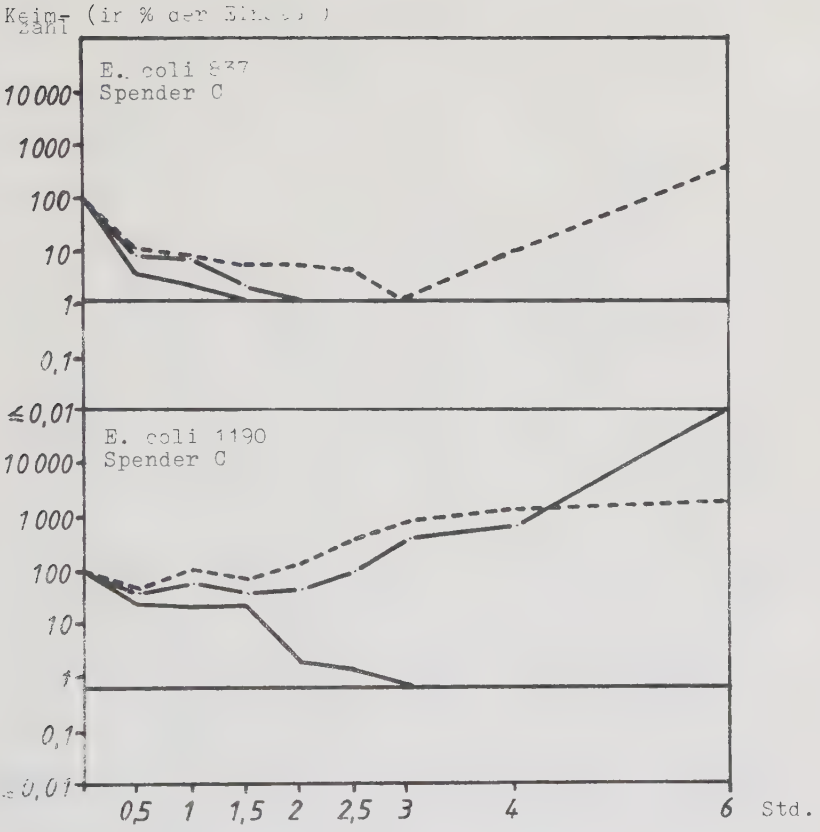


Abb. 20: Wirkung von Leukozyten auf Escherichia coli in aktivem Plasma

100 % ≙ Bakterieneinsatz

---------- ohne Leukozyten

—·—·—·—·— Leukozytenkonzentration/ml: 1,5 x 10⁶

——————— Leukozytenkonzentration/ml: 3,0 x 10⁶

Tabelle 12.1.: Wirkung von Leukozyten auf Escherichia coli in aktivem Blutplasma

Spender	Stamm	Leukozyt.-Konzentr. (pro ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6	8
A	E. coli 837	5×10^6	$1{,}8 \times 10^3$	177,8	183,3	111,1	83,3	411,1	461,1	411,1	——	——
	E. coli 837	0	$1{,}8 \times 10^3$	116,7	133,3	483,3	833,3	1222,2	2944,4	26111,1	——	——
	E. coli 1189	5×10^6	$4{,}8 \times 10^3$	77,1	62,5	64,6	81,3	56,3	70,8	154,2	——	——
	E. coli 1189	0	$4{,}8 \times 10^3$	52,1	43,8	47,9	14,6	29,2	<2,1	<2,1	——	——
B	E. coli 837	3×10^7	6×10^3	83,3	50	<1,67	<1,67	<1,67	<1,67	<1,67	<1,67	<1,67
	E. coli 837	0	10^3	70	60	70	90	390	1200	10000	120000	3300000
	E. coli 1189	3×10^7	5×10^2	100	120	40	<20	<20	<20	<20	<20	<20
	E. coli 1189	0	6×10^2	133,3	100	183,3	66,7	33,3	16,7	133,3	<16,7	<16,7

Tabelle 12.2.: Wirkung von Leukozyten auf Escherichia coli in aktivem Blutplasma

Spender	Stamm	Leukozyt.-Konzentr. (pro ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
C	E. coli 837	$3,0 \times 10^7$	$9,6 \times 10^3$	3,13	2,08	1,04	<1,04	<1,04	<1,04	<1,04	<1,04
	E. coli 837	$1,5 \times 10^7$	$9,6 \times 10^3$	7,29	6,25	2,08	<1,04	<1,04	<1,04	<1,04	<1,04
	E. coli 837	0	$9,6 \times 10^3$	10,42	7,29	5,21	5,21	4,17	1,04	9,38	385,42
	E. coli 1190	$3,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^4$	22,5	20	20,63	1,88	1,25	0,63	<0,63	<0,63
	E. coli 1190	$1,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^4$	38,75	54,38	38,13	43,75	93,75	393,75	606,25	112500
	E. coli 1190	0	$1,6 \times 10^4$	43,75	100	68,75	125	375	750	1250	1750

III.13. Beeinflussung des Wachstums von E. coli durch Leukozyten in aktivem Plasma nach Vorschädigung der Keime durch Penicillin G

In diesem Kapitel sind mehrere Versuche zusammengefaßt, in denen das Wachstumsverhalten von drei E. coli Stämmen untersucht wurde. Die Keime waren zuvor einer antibiotischen Vorschädigung durch Penicillin ausgesetzt. Variiert wurden die Dauer der Penicillinbehandlung, die Konzentration des Penicillins sowie die Leukozytenkonzentration. Außerdem wurden mehrere Spender für Plasma und Leukozyten in Anspruch genommen.

Im Versuch A wurde der Stamm E. coli 1189 zunächst zwei Stunden lang mit 1/2-, 1- und 2x MHK in aktivem Plasma vorbebrütet. Nach Elimination des Antibiotikums waren die Keime für weitere sechs Stunden im Brutschrank in aktivem Plasma einer Leukozytenkonzentration von 5×10^6 Leukozyten pro ml ausgesetzt. Im Vergleich wurden ebenfalls Proben ohne Leukozyten untersucht. Wie Abbildung 21 zeigt, wachsen die leukozytenexponierten Keime im gesamten Versuchszeitraum nicht aus und liegen unter der Nachweisgrenze von 10^2 Keimen pro ml. Demgegenüber erfolgt in den leukozytenfreien Proben ein rasches Wachstum der Keime. Während diejenigen, die zuvor einer Konzentration von 1/2 und 2x MHK Penicillin G ausgesetzt waren, einen weitgehend gleichen Wachstumsverlauf zeigen, ist die Wachstumsgeschwindigkeit in den mit 1 MHK vorbebrüteten Proben gegenüber den beiden anderen leicht verzögert. Hier scheint also die antibakterielle Aktivität der Leukozyten das Auswachsen der Keime zu verhindern.

Im Versuch B ist das Ergebnis fast umgekehrt. Im Unterschied zum Versuch A wurden hier Plasma und Leukozyten von einem anderen Probanden gespendet. Die Leukozytenkonzentration betrug 4×10^6 pro ml.

Darüber hinaus sind die Bedingungen mit Versuch A identisch. Auch die Konzentrationen der Keimeinsaat unterscheiden sich nur unwesentlich, wie aus Tabelle 13 (B) hervorgeht. Die Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 21 (unten) zeigt, daß das Wachstum der leukozytenexponierten Keime weniger beeinträchtigt ist, als das in den leukozytenfreien Proben. In den letzteren sind bereits zur Stunde 0,5 keine Keime mehr nachweisbar. Während die mit 1 MHK vorbebrüteten Keime die Nachweisgrenze nicht wieder erreichen, wachsen die mit 2 MHK vorbehandelten zur Stunde 3 und die mit 1/2 MHK vorbehandelten zur Stunde 4 wieder aus. Demgegenüber wachsen unter Leukozyteneinfluß die mit 1/2 MHK geschädigten Keime nach einer initialen Bakterizidiephase zur Stunde 1, die mit 1 MHK behandelten zur Stunde 2,5 wieder aus und zeigen einen fast deckungsgleichen Wachstumsverlauf. Die Probe, die 2 MHK Penicillin ausgesetzt war, zeigt im weiteren Verlauf eine etwa einstündige Verzögerung gegenüber den anderen beiden Proben bei fast gleicher Wachstumsgeschwindigkeit.

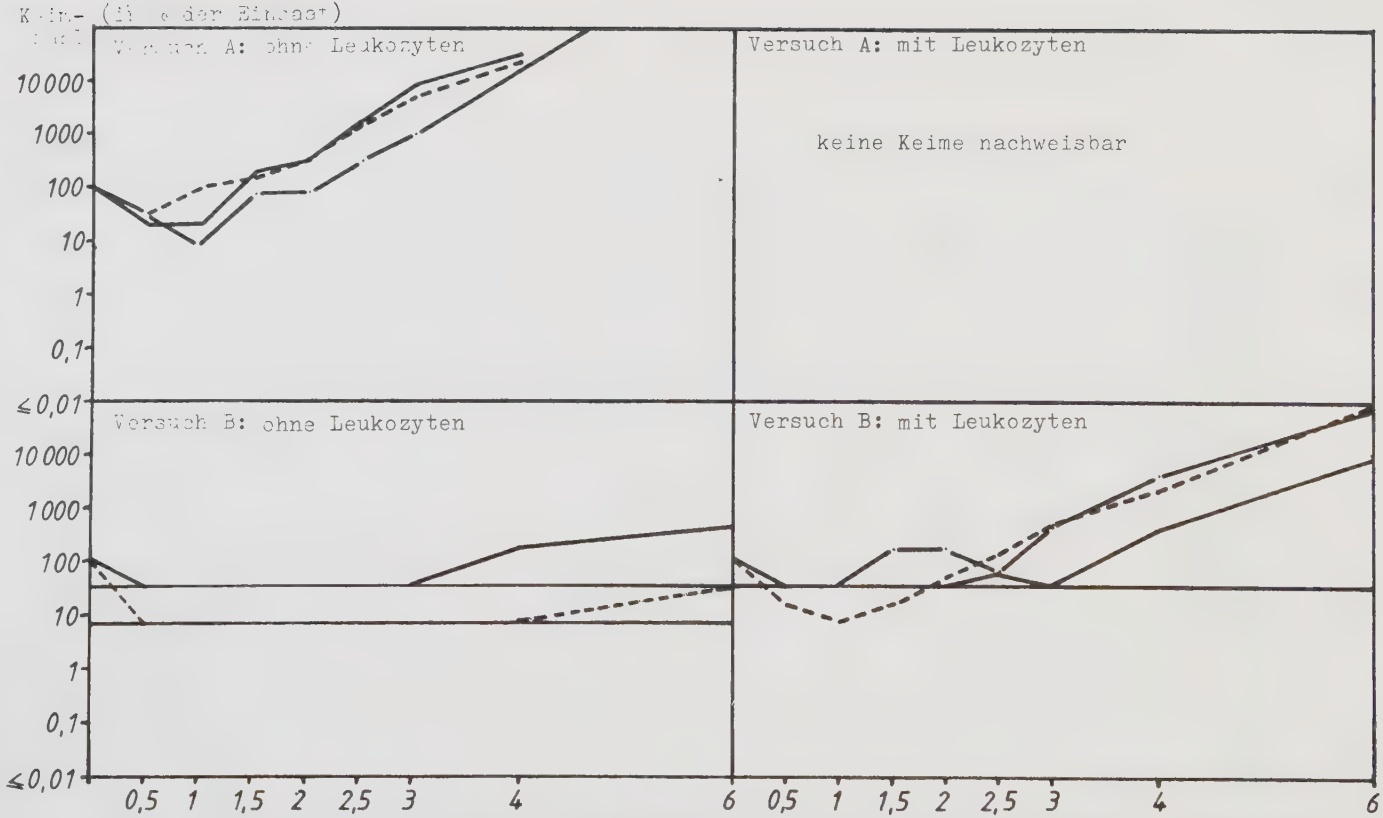


Abb. 21: Wirkung von Leukozyten auf Escherichia coli 1189 in aktivem Plasma nach zweistündiger Vorschädigung der Keime durch Penicillin G

100 % ≙ Bakterieneinsaat

1/2 MHK
1x MHK
2x MHK
Penicillinkonzentration

Tabelle 13: Wirkung von Leukozyten auf Escherichia coli 1189 in aktivem Blutplasma nach zweistündiger Vorschädigung der Keime durch Penicillin G (MHK von E. coli 1189: 50 IE)

	Penicillin G-Konzentration (pro ml)	Leukozyten-Konzentration (pro ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
	25 IE	0	10^3	30	90	130	300	1200	4900	22000	
	50 IE	0	$1{,}3 \times 10^3$	30,77	7,7	76,92	84,62	300	1000	——	(6076923)
	100 IE	0	5×10^2	20	20	160	300	1540	8200	31000	
A											
	25 IE	5×10^6	$3{,}3 \times 10^2$								
	50 IE	5×10^6	$4{,}3 \times 10^2$	keine Keime nachweisbar							
	100 IE	5×10^6	$1{,}67 \times 10^2$								
	25 IE	0	$1{,}5 \times 10^3$	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	33,33
	50 IE	0	3×10^2	33,33	<33,33	<33,33	33,33	<33,33	<33,33	33,33	<33,33
	100 IE	0	3×10^2	<33,33	<33,33	<33,33	<33,33	33,33	<33,33	166,67	400
B											
	25 IE	4×10^6	$1{,}5 \times 10^3$	13,33	6,67	13,33	46,67	113,33	413,33	1866,7	93333
	50 IE	4×10^6	3×10^2	33,33	33,33	166,67	166,67	66,67	400	3666,7	76667
	100 IE	4×10^6	3×10^2	33,33	33,33	33,33	33,33	66,67	33,33	333,33	9666,7

Der Versuch C wurde ebenfalls mit dem Stamm E. coli 1189 durchgeführt. Im Unterschied zu den beiden bisher beschriebenen Versuchen wurden die Keime nur eine Stunde lang Penicillinkonzentrationen von 1/4-, 1/2- und 1 MHK in aktivem Plasma ausgesetzt. Anschließend erfolgte nach Penicillinelimination die weitere Bebrütung der Keime. Der eine Teil der Proben wurde dem Einfluß von 5×10^6 Leukozyten pro ml ausgesetzt, während der andere wiederum leukozytenfrei blieb. Bei der Betrachtung der graphischen Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 22 fällt ein recht gleichförmiger Verlauf der verschiedenen Wachstumskurven auf. Bei den leukozytenfreien Proben kommt es zwischen der dritten und sechsten Stunde zu geringfügigen Unterschieden, wobei die Wachstumsgeschwindigkeiten den Penicillinkonzentrationen in der Phase der Vorschädigung entsprechen. So zeigt die mit 1/4 MHK vorbehandelte Probe ein etwas schnelleres Wachstum als die, die 1/2 MHK ausgesetzt war; die durch 1 MHK vorbehandelte Probe wächst am langsamsten aus. - Bei den leukozytenhaltigen Proben zeigen sich kaum bemerkenswerte Unterschiede. Es fällt lediglich auf, daß die Kurve der mit 1/4 MHK vorgeschädigten Keime im gesamten Versuchszeitraum geringfügig oberhalb der beiden übrigen Kurven liegt. Vergleicht man die Kurven der leukozytenfreien mit denen der leukozytenexponierten Keime, so fällt folgendes auf: letztere wachsen zur Stunde 3 wieder aus, während dies bei den leukozytenfreien Keimen um die Stunde 2, also etwa eine Stunde früher geschieht. Vergleicht man -ausgehend vom Zeitpunkt des Wiederauswachsens der leukozytenfreien Keime- die Zeiträume, in denen die Keimkonzentration um eine Zehnerpotenz ansteigt, so zeigt sich, daß eine Wachstumsverzögerung der leukozytenhaltigen gegenüber

den leukozytenfreien Keimen vorliegt. Wie aus Tabelle 15 hervorgeht, ist diese Verzögerung umso größer, je geringer die Penicillinkonzentration in der Phase der Vorschädigung war.

Tabelle 15:

Vergleich der Zeiträume T, in denen sich die Keimkonzentration beim Versuch C um eine Zehnerpotenz erhöht, gemessen vom Zeitpunkt des Wiederauswachsens in den leukozytenfreien Proben

Penicillin G Konzentration	T_1 (Std.) (leukozytenhaltige Proben)	T_2 (Std.) (leukozytenfreie Proben)	$T_1 - T_2$ (Std.)
1/4 MHK	4	1,5	2,5
1/2 MHK	3,75	2	1,75
1 MHK	3,5	3	0,5

Die Phase der initialen Bakterizidie erfolgt bei den leukozytenfreien Keimen am intensivsten. So sinken die Keimkonzentrationen bis zur Stunde 1,5 bzw. 2 auf Werte von 0,8 %, 1,4 % und 2,6 % der Ausgangskonzentration ab. In den leukozytenhaltigen Proben dagegen ist die initiale Bakterizidiephase bereits zur Stunde 0,5 beendet und führt zu einer Keimzahlreduktion auf Werte von 19,3 %, 9,0 % und 9,2 % der Anfangskonzentration.

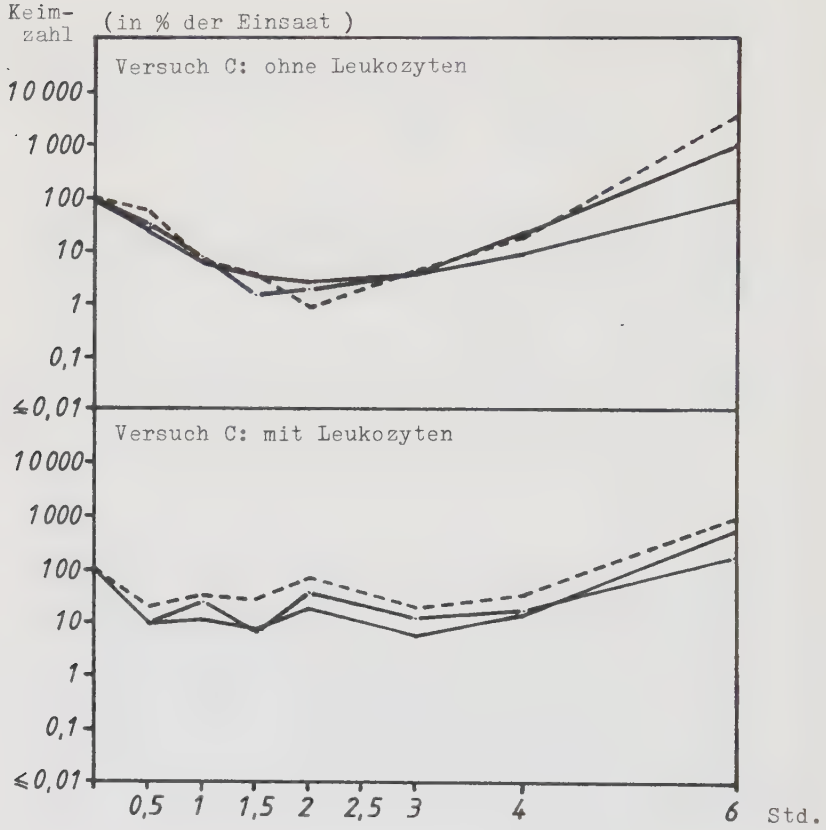


Abb. 22: Wirkung von Leukozyten auf E. coli 1189 in aktivem Plasma nach einstündiger Vorschädigung durch Penicillin G

100 % ≙ Bakterieneinsaat

- - - - - - - - - - 1/4 MHK
——————— 1/2 MHK
—·—·—·—·— 1 MHK

Penicillinkonzentration

Tabelle 14: Wirkung von Leukozyten auf E. coli 1189 in aktivem Blutplasma nach einstündiger Vorschädigung der Keime durch Penicillin G (MHK von E. coli 1189: 50 IE)

Penicillin G-Konzentration (pro ml)	Leukozyten-Konzentration (pro ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	3	4	6
12,5 IE	0	$2,7 \times 10^5$	51,85	6,48	3,59	0,81	4,33	19,26	3074,07
25 IE	0	$1,69 \times 10^5$	29,59	7,22	1,42	1,95	3,96	23,67	982,25
50 IE	0	$1,45 \times 10^5$	25,66	6,21	3,45	2,55	3,72	8,28	88,97
12,5 IE	5×10^6	$2,7 \times 10^5$	19,26	30,37	25,93	64,44	20	31,11	859,26
25 IE	5×10^6	$1,69 \times 10^5$	8,99	23,67	5,92	34,32	11,83	17,75	189,35
50 IE	5×10^6	$1,45 \times 10^5$	9,24	10,34	6,90	17,24	5,52	13,79	524,14

Im Versuch D wurde der resistente Stamm E. coli 837 untersucht. Die zuvor durchgeführte MHK-Bestimmung gegenüber Penicillin G hatte ergeben, daß die MHK dieses Stammes größer als 1600 IE/ml war. Zunächst erfolgte eine Bebrütung der Keime für zwei Stunden in aktivem Plasma mit Penicillin G in Konzentrationen von 400 IE/ml (Gruppe I) und 200 IE/ml (Gruppe II). Nach dessen Elimination und anschließender Zugabe von Leukozyten in Konzentrationen von 5×10^6/ml und 10^7/ml wurden die Keime weiter bebrütet. In der Gruppe I kam eine weitere Probe hinzu mit $1{,}3 \times 10^7$ Leukozyten pro ml. Plasma und Leukozyten dieser Probe stammen von einem anderen Probanden als in den übrigen Proben. Wie Abbildung 23 zeigt, ist in beiden Gruppen das Wachstum der Keime, die unter dem Einfluss von 10^7 Leukozyten pro ml stehen, gegenüber denen mit 5×10^6 Leukozyten pro ml verzögert. Während diese Verzögerung in der Gruppe II deutlich auffällt, ist sie in Gruppe I nur geringfügig. Dieser Unterschied kommt durch eine geringere Wachstumshemmung in der Probe mit 5×10^6 Leukozyten pro ml der Gruppe II gegenüber der Gruppe I zustande. Demgegenüber zeigt sich in beiden Gruppen bei den Proben mit 10^7 Leukozyten pro ml ein nahezu deckungsgleicher Verlauf der Wachstumskurven. Eine initiale Keimzahlreduktion liegt in beiden Gruppen nicht vor. Einen wesentlich anderen Wachstumsverlauf nehmen die Keime jedoch unter dem Einfluss von $1{,}3 \times 10^7$ Leukozyten pro ml des anderen Probanden. Hier erfolgt bis zur Stunde 2,5 ein Keimzahlrückgang auf 1,75 % der Anfangskonzentration mit einer anschließenden Wachstumshemmung. Zur Stunde 4 wachsen die Keime wieder aus.

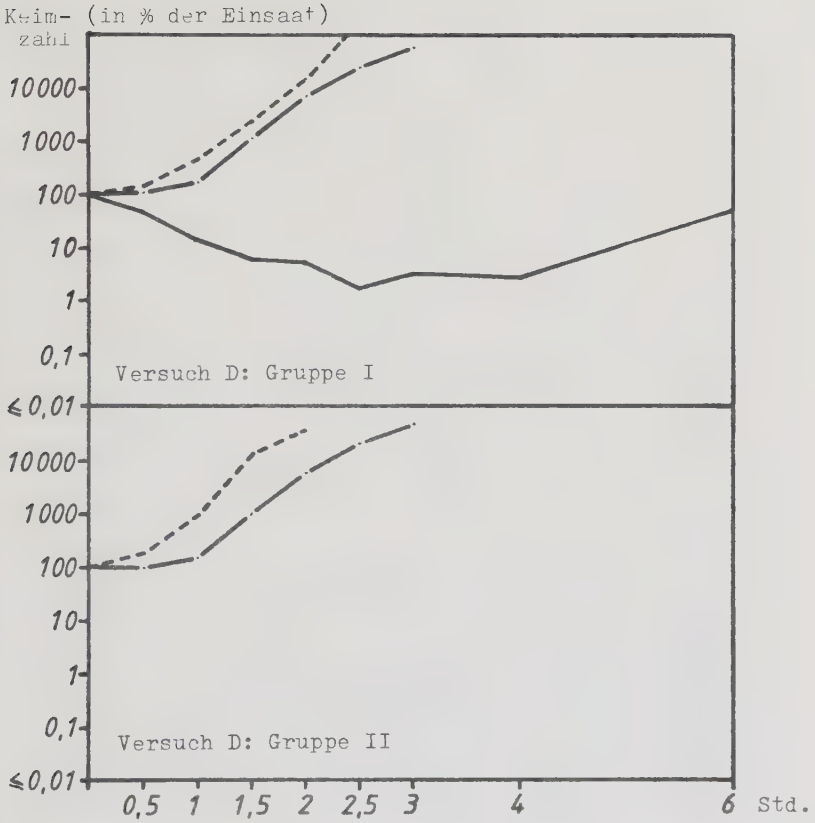


Abb. 23: Wirkung von Leukozyten auf Escherichia coli 837 in aktivem Plasma nach zweistündiger Vorschädigung der Keime durch Penicillin G

100 % ≙ Bakterieneinsaat

—·—·—·— Leukozytenkonzentration/ml: $1{,}0 \times 10^7$

– – – – – – Leukozytenkonzentration/ml: 5×10^6

——— Leukozytenkonzentration/ml: $1{,}3 \times 10^7$ (anderer Proband)

Tabelle 16: Wirkung von Leukozyten auf Escherichia coli 837 in aktivem Blutplasma nach zweistündiger Vorschädigung der Keime durch Penicillin G (MHK von E. coli 837: >1600 IE)

	Penicil.G Konzentr. (pro ml)	Leukozyt. Konzentr. (pro ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
I	400 IE	$1{,}3 \times 10^7$	$1{,}2 \times 10^5$	45	12,25	5,25	5	1,75	3	2,75	50
	400 IE	$1{,}0 \times 10^7$	$1{,}75 \times 10^5$	102,86	160	1028,57	6285,71	22286	50286		
	400 IE	5×10^6	$1{,}75 \times 10^5$	142,86	457,14	2285,71	14857	188571	685714		
II	200 IE	$1{,}0 \times 10^7$	$1{,}9 \times 10^5$	94,74	147,37	947,37	5789,47	20526	46316		
	200 IE	5×10^6	$1{,}9 \times 10^5$	189,47	894,74	12105	36842	352631	947368		

Im Versuch E, dem letzten dieses Kapitels, war der Versuchskeim E. coli 1190. Er wurde zunächst in aktivem Plasma unter Penicillin G in einer Konzentration von 1/2- (Gruppe I) und 1/4 MHK (Gruppe II) bebrütet. Das Penicillin wurde nach zwei Stunden eliminiert. Nach anschließender Zugabe von Leukozyten erfolgte eine weitere Bebrütung der Keime. Es gab drei Proben in jeder Gruppe, von denen die erste leukozytenfrei blieb, die zweite 10^7- und die dritte 2 x 10^7 Leukozyten pro ml enthielt. - In der Gruppe II wachsen die Keime aller drei Proben sofort aus. Die Kurven der beiden leukozytenhaltigen Proben sind fast deckungsgleich, die der leukozytenfreien Probe zeigt nur ein geringfügig schnelleres Wachstum (Abb. 24). Hier wird das Keimwachstum also kaum durch Leukozyten beeinflußt. Im Vergleich hiermit zeigt sich in der Gruppe I bei allen Proben eine deutliche Wachstumsverzögerung. Diese wird durch Tabelle 18 veranschaulicht, in der die entsprechenden Werte beider Gruppen miteinander verglichen werden. Auffällig ist außerdem, daß in der Gruppe I eine stärkere Wachstumsdivergenz zwischen leukozytenhaltigen und leukozytenfreien Keimen erfolgt. Die unterschiedliche Leukozytenkonzentration zeigt jedoch in keiner der beiden Gruppen eine wesentliche Beeinflussung des Wachstums.

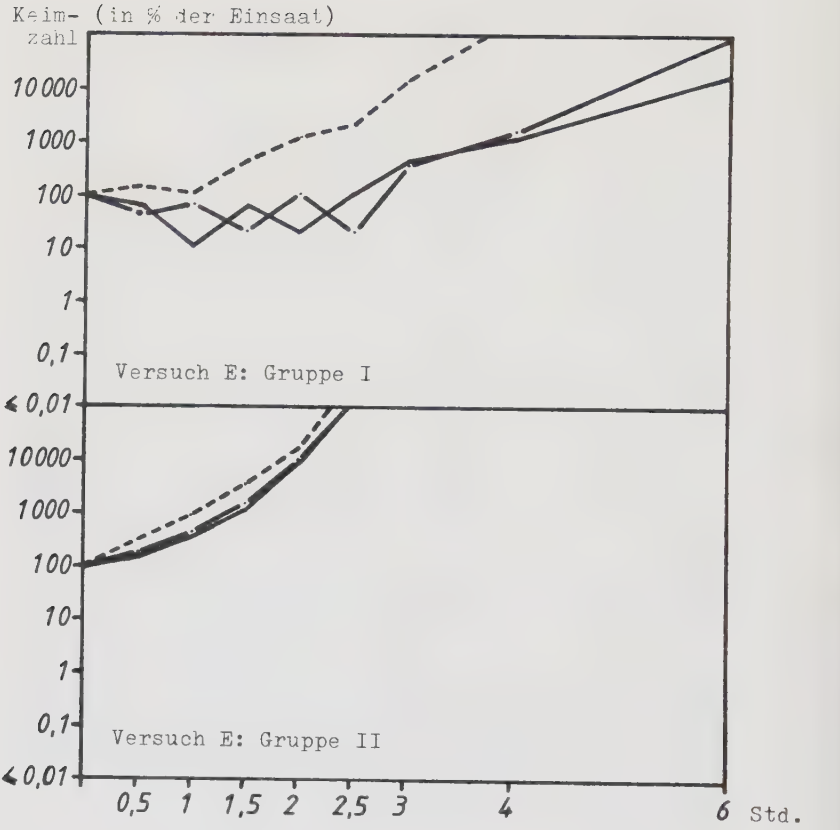


Abb. 24: Einfluß von Leukozyten auf das Wachstumsverhalten des Stammes E. coli 1190 in aktivem Plasma nach zweistündiger Vorschädigung mit 1/2 und 1/4 MHK Penicillin G

100 % ≙ Bakterieneinsaat

– – – – – – – – – – ohne Leukozyten

—·—·—·—·— Leukozytenkonzentration: 10^7/ml

———————— Leukozytenkonzentration: 2 x 10^7/ml

Tabelle 17: Einfluß von Leukozyten auf das Wachstumsverhalten des Stammes E. coli 1190 in aktivem Blutplasma nach zweistündiger Vorschädigung mit 1/2 und 1/4 MHK Penicillin G (MHK von E. coli 1190: 50 IE)

	Penicil.G Konzentr. (pro ml)	Leukozyt. Konzentr. (pro ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
I	25 IE	0	10^3	140	100	400	1200	2100	14000	220000	400000000
	25 IE	10^7	10^3	40	60	20	100	20	360	1500	96000
	25 IE	2×10^7	10^3	60	10	60	20	100	440	1100	17000
II	12,5 IE	0	$2{,}4 \times 10^5$	300	916,67	3666,67	15833	333333			
	12,5 IE	10^7	$2{,}4 \times 10^5$	187,5	416,67	1500	10000	129167			
	12,5 IE	2×10^7	$2{,}4 \times 10^5$	170,83	375	1083,33	8750	145833			

Tabelle 18:

Vergleich der im Versuch E erforderlichen Zeiten T zur Erhöhung der Keimkonzentration um eine Zehnerpotenz, gemessen ab Stunde 0

Penicillin G Konzentration	T_1 (Std.) (leukozyten-freie Probe)	T_2 (Std.) Leukozyten: 10^7/ml	T_3 (Std.) Leukozyten: 2 x 10^7/ml
Gruppe I 1/2 MHK	2	3,75	4
Gruppe II 1/4 MHK	1	1,25	1,5
$T_{n(I)} - T_{n(II)}$	1	2,5	2,5

III.14. Beeinflussung des Wachstums von E. coli durch Leukozyten in aktivem Plasma nach Vorschädigung der Keime durch Ampicillin

In vier Versuchen wurde das Wachstum von E. coli Stämmen (E. coli 1189 und E. coli 837) unter folgenden Bedingungen untersucht: zunächst erfolgte eine zweistündige Bebrütung der Keime mit 1/2 MHK Ampicillin in aktivem Plasma. Nach Elimination des Antibiotikums wurde die Bebrütung in zwei Proben fortgesetzt, wobei in eine der beiden Leukozyten gegeben wurden. Zur Vereinfachung der Beschreibung seien die Versuche numeriert:

Nr.	Stamm	Leukozyten-konzentration	Leukozyten- und Plasmaspender
1	E. coli 1189	0 und $1{,}5 \times 10^7$	A
2	E. coli 837	0 und $1{,}5 \times 10^7$	A
3	E. coli 1189	0 und $7{,}5 \times 10^6$	B
4	E. coli 837	0 und $7{,}5 \times 10^6$	C

Bei der Betrachtung der Abbildung 25 erkennt man, daß bei jedem Versuch das Wachstum in den leukozytenhaltigen Proben gegenüber den leukozytenfreien deutlich verzögert ist. Beim Versuch 2 sind sogar über den gesamten Versuchszeitraum in der leukozytenhaltigen Probe keine Keime nachweisbar. Allerdings liegt hier die Nachweisgrenze aufgrund der geringen Einsaat (8×10^2 Keime/ml) bereits bei 12,5 %. In den Versuchen 1 und 2 ist bei beiden Proben eine initiale Bakterizidiephase zu erkennen, während in den Versuchen 3 und 4 die Keime der leukozytenfreien und der leukozytenhaltigen Proben sofort auswachsen. Ein Vergleich der entsprechenden Kurven aus Versuch 1 und 3 bzw. 2 und 4 zeigt, daß das Wachstum unter der Leukozytenkonzentration $1{,}5 \times 10^7$ pro ml stärker gehemmt wird als unter derjenigen von $7{,}5 \times 10^6$ pro ml. Über den gesamten

Versuchszeitraum betrachtet macht der Versuch 1 hierin eine Ausnahme: In der leukozytenhaltigen Probe setzt zur Stunde 2,5 ein erneutes Wachstum ein. Sie übersteigt etwa zur Stunde 4,5 die Keimkonzentration der leukozytenfreien Probe (Tab. 20).

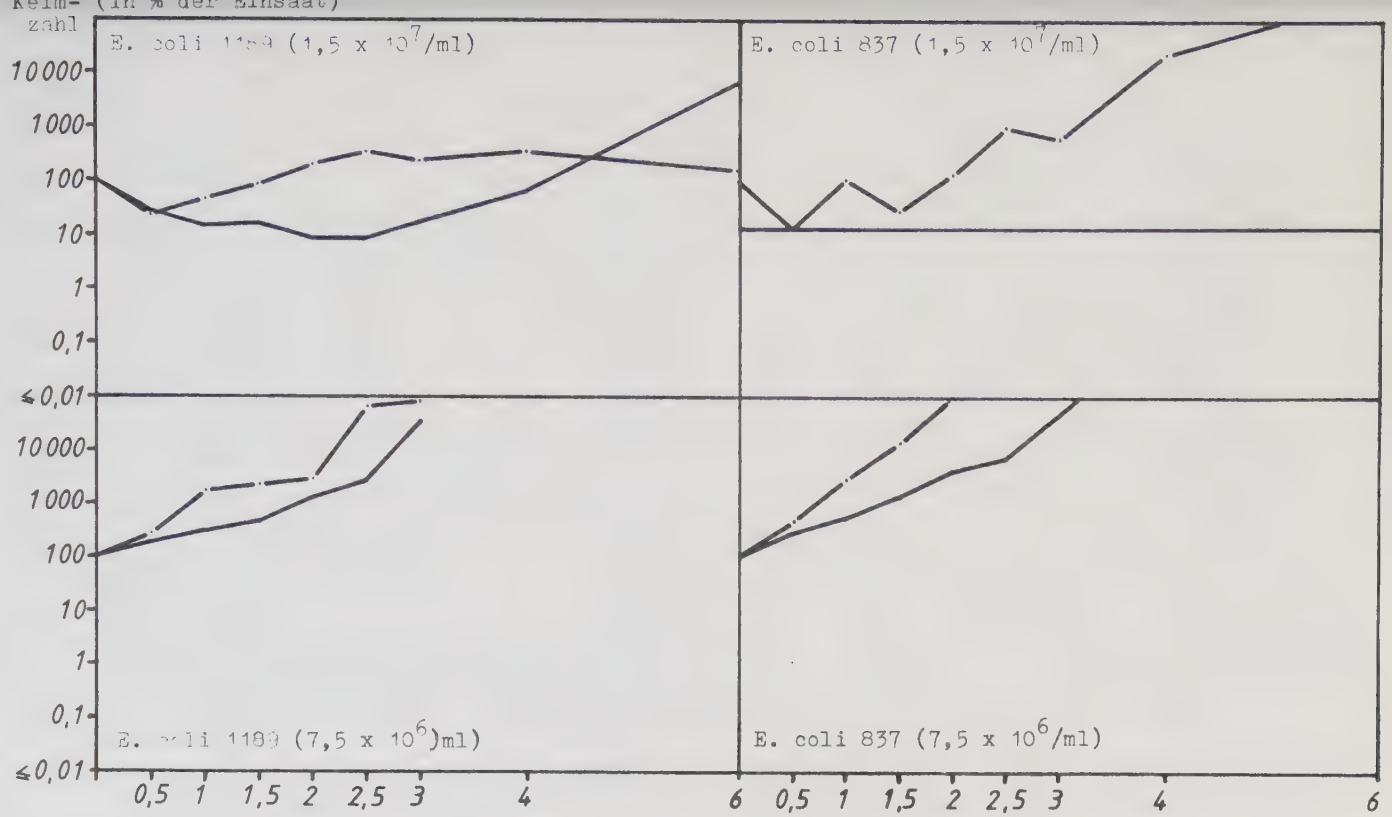


Abb. 25: Wachstumsverhalten von Escherichia coli in aktivem Plasma unter Leukozyteneinfluß nach zweistündiger Vorschädigung mit 1/2 MHK Ampicillin

100 % ≙ Bakterieneinsaat —·—·—·— ohne Leukozyten ——— mit Leukozyten

Tabelle 19: Wachstumsverhalten von Escherichia coli in aktivem Plasma unter Leukozyteneinfluß nach zweistündiger Vorschädigung mit 1/2 MHK Ampicillin

Stamm	Ampicil.-Konzentr. (μg/ml)	Leukoz.-Konzentr. (pro ml)	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat zur Stunde 0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6
1189	1	0	5×10^5	22	42	82	200	320	240	340	152
1189	1	$1,5 \times 10^7$	5×10^5	26	14,4	15,2	8,4	8,4	16,4	60	6200
837	64	0	8×10^2	<12,5	100	25	125	925	550	21250	312500
837	64	$1,5 \times 10^7$	8×10^2	<12,5	<12,5	<12,5	<12,5	<12,5	<12,5	<12,5	<12,5
1189	1	0	10^6	280	1600	2200	2900	65000	80000		
1189	1	$7,5 \times 10^6$	10^6	200	300	480	1200	2900	31000		
837	64	0	$4,5 \times 10^5$	444,44	2666,67	12889	115556	217778	311111		
837	64	$7,5 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	288,89	533,33	1333,33	4000	7111,11	44444	1600000	

Tabelle 20:

Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten der leukozytenhaltigen und leukozytenfreien Keimproben.
(T: Zeitraum, in dem die Keimkonzentration, gemessen ab Stunde 0, um eine Zehnerpotenz ansteigt)

	Versuchsnummer:			
	1	2	3	4
Probe	T_1(Std.)	T_2(Std.)	T_3(Std.)	T_4(Std.)
leukozytenhaltig (a)	4,75	> 6	1,75	1,25
leukozytenfrei (b)	>6	4	0,75	0,75
$T_{n(a)} - T_{n(b)}$	<1,25	>2	1	0,5

Tabelle 21:

Vergleich der Wachstumskurven der Keimproben mit unterschiedlicher Leukozytenkonzentration
(T: Zeitraum, in dem die Keimkonzentration, gemessen ab Stunde 0, um eine Zehnerpotenz ansteigt)

Leukozytenkonzentration (pro ml)	E. coli 1189 T_1(Std.)	E. coli 837 T_2(Std.)
$1,5 \times 10^7$ (a)	4,25	>6
$7,5 \times 10^6$ (b)	2	1,5
$T_{n(a)} - T_{n(b)}$	2,25	>4,5

IV. Diskussion

Die üblicherweise angewandten Untersuchungsverfahren zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von Antibiotika in vitro (Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration und der Bakterizidiekinetik) (9,15) berücksichtigen nur die direkte Beeinflussung der Keime durch die zu testenden Substanzen. Die Situation in vivo unterscheidet sich demgegenüber jedoch unter anderem dadurch, daß durch die körpereigenen, zellulären und humoralen Abwehrmechanismen eine zusätzliche antibakterielle Potenz vorhanden ist. Wachsendes Interesse an möglichen Interaktionen zwischen Antibiotika und diesen körpereigenen Abwehrmechanismen haben einen wesentlichen Grund in der Tatsache, daß bei Patienten mit defekten Abwehrsystemen die Infektionsbehandlung durch Antibiotika häufig nicht zum klinischen Erfolg führt. So wurde erst kürzlich an der Frankfurter Universitätsklinik in einer Untersuchung über 'Septikämische Erkrankungen bei Patienten mit Abwehrschwäche' (11) die Letalität von Septikämien bei Patienten mit und ohne myeloische Insuffizienz verglichen. Hierbei wurde festgestellt, daß von 81 Patienten, die eine Granulozytopenie hatten (weniger als 1000 Granulozyten/ml), 64 % die Septikämie nicht überlebten. Demgegnüber starben hieran nur 36 % der 101 Patienten, die mehr als 1000 Granulozyten pro ml hatten. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß eine nicht hinreichende Anzahl von funktionsfähigen Granulozyten die Wirksamkeit eines Antibiotikums in vivo schwächen kann. Zur Frage nach einer möglichen Beeinflussung der antibakteriellen Aktivität körpereigener Abwehrkräfte durch Antibiotika wurden bereits

eine Reihe von Untersuchungen veröffentlicht, auf die hier teilweise später eingegangen werden soll. Auch die vorliegende Arbeit versteht sich als ein Beitrag zur Klärung dieser Zusammenhänge. Es wurden hier ausschließlich in vitro Versuche durchgeführt. Dabei wurde ein methodisches Vorgehen gewählt, bei dem das Blut bzw. seine Bestandteile als die Träger der körpereigenen Abwehr möglichst wenig beeinträchtigt werden. Hierdurch sollte die Verfälschung der in vivo-Situation minimiert und somit die Verwertbarkeit der Ergebnisse verbessert werden.

Im ersten Teil der Versuche (III.1.- III.8.) wurde das Wachstum mehrerer plasmaresistenter E. coli und K. pneumoniae-Stämme unter dem Einfluß subinhibitorischer Ampicillin- und Mezlocillinkonzentrationen (1/2 MHK) in Müller-Hinton Bouillon und in Vollblut untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 1-15 graphisch dargestellt. Der Vergleich der Wachstumskurven ohne antibiotischen Einfluß in MHB und im Blut zeigt im Blut in allen Fällen eine Wachstumsbeeinträchtigung, die von starker Verzögerung bis zu deutlicher Bakterizidie reicht. Dies zeigt, daß eine antibakterielle Potenz des Blutes vorhanden ist, die sowohl gegenüber E. coli als auch gegenüber K. pneumoniae ohne antibiotischen Einfluß zum Tragen kommt. Die Betrachtung des Keimwachstums mit Antibiotika in MHB und Blut zeigt, daß auch hier die Keimzahl im Blut gegenüber der in MHB reduziert ist. Dabei ist der Unterschied so groß, daß eine additive Wirkung von Blut und Antibiotikum angenommen werden kann. Das Vorliegen eines Synergismus zwischen Blut und Antibiotikum wird jedoch aus diesen Ergebnissen nicht deutlich. Vergleicht man aber das Wachstumsverhalten der Keime nach der Elimination des

Antibiotikums zur zweiten Versuchsstunde, so geben einige Ergebnisse Anlaß, einen solchen Synergismus zu vermuten. Dies zeigt sich darin, daß im Blut das Wachstum der Keime nach Elimination des Antibiotikums gegenüber dem Wachstum in der antibiotikumfreien Probe verzögert ist. Diese Verzögerung kann nicht auf eine Nachwirkung des Antibiotikums alleine zurückgeführt werden, da es, wie aus den Abbildungen 2, 4 und 6 zu ersehen ist, nach Antibiotikumelimination in MHB sogar zu einer Wachstumsbeschleunigung kommt. Demzufolge scheint, wie die Abbildungen 13 und 14 zeigen, ein Synergismus zwischen Ampicillin und Vollblut gegenüber K. pneumoniae bei allen drei Ampicillin-sensiblen Stämmen vorzuliegen. Bei den übrigen Versuchen (K. pneumoniae gegenüber Mezlocillin, E. coli gegenüber Mezlocillin und Ampicillin) kann aufgrund des Kurvenverlaufs keine generelle Aussage zu einem möglichen Synergismus gemacht werden, jedoch zeigt sich auch hier bei jeweils einem Stamm ein synergistischer Effekt. Weiterhin wird deutlich, daß das Blut bei niedriger Keimzahl ($\leq 10^2$ Keime/ml) ein Wiederauswachsen der Keime verhindern kann. So wächst keiner der E. coli-Stämme nach Ampicillin- bzw. Mezlocillinelimination während des Versuchszeitraumes wieder aus. Das gleiche zeigt sich bei den drei sensiblen Stämmen von K. pneumoniae gegenüber Mezlocillin. Bestätigt wird diese Feststellung durch die in Abbildung 16 dargestellten Versuchsergebnisse. Sie zeigen das Wachstum von E. coli und K. pneumoniae in Blut nach zweistündiger Vorschädigung mit 1/2 MHK Mezlocillin. Im Unterschied zu den vorherigen Versuchen (Abb. 11 und 15) können sich die Keime gegenüber dem Blut stärker behaupten. Da hier die Keimkonzentration (Tabelle 9) nach

Elimination des Antibiotikums höher liegt als in den vorangegangenen Versuchen (Tab. 6 und 8), muß hierin eine Ursache für die verstärkte Resistenz der Keime gegenüber dem Blut angenommen werden.

Die Versuche, die in den Kapiteln III.10.-III.14. beschrieben sind, dienten der Untersuchung verschiedener Komponenten des Blutes hinsichtlich ihrer antibakteriellen Eigenschaften alleine und zusammen mit Antibiotikum. In Bezug auf die Funktion der Leukozyten zeigte sich (Abb. 19), daß diese ohne antibiotische Beeinflussung die antibakterielle Aktivität des Plasmas erhöhen, also Keime phagozytieren und abtöten. Dieser Effekt verstärkt sich mit zunehmender Leukozytenkonzentration (Abb. 20). Die recht verschiedenen Ergebnisse der Versuche, in denen die Keime antibiotisch vorgeschädigt wurden, lassen keine einheitliche Antwort auf die Frage zu, ob die Wirkung der Leukozyten durch die Vorschädigung der Keime verstärkt wird. Einige Versuchsergebnisse sprechen jedoch dafür, daß durch Penicillin vorgeschädigte Keime von Leukozyten leichter abgetötet werden können. So sieht man beispielsweise auf Abbildung 24, daß eine Erhöhung der Penicillinkonzentration in der Phase der Vorschädigung der Keime die nachfolgende Leukozytenwirkung deutlich verstärkt. Ebenso zeigt sich in Abbildung 21, Versuch A, daß Penicillinvorgeschädigte Keime im Plasma schnell wieder auswachsen, unter der Wirkung von Leukozyten jedoch bereits in der Anfangsphase vollkommen abgetötet werden. Eine Auswirkung der Penicillinkonzentration während der Vorschädigungszeit auf die Wirkung der Leukozyten, wie sie in Abbildung 24 deutlich wird, ist in den Versuchen C und D (Abb. 22 und 23) nicht zu erkennen. Aus diesen Versuchsergebnissen läßt sich

somit nicht generell auf eine durch antibiotische Vorschädigung verursachte Zunahme der antibakteriellen Aktivität der Leukozyten schließen.

Auch die Literatur gestattet es nicht, zu diesem Punkt eine eindeutige Aussage zu machen (4,5, 6,7,8,10,12,14). Ein Grund hierfür ist, daß die Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse durch teilweise große Unterschiede in Material und Methodik sehr eingeschränkt wird. Die Variationen betreffen: Keime, Antibiotika, Leukozytenart und -spender, Serumaktivität und -spender sowie die Konzentrationen dieser Faktoren und die Dauer der Vorschädigung. Hinzu kommt die Unterschiedlichkeit der Verfahren zur Leukozytengewinnung sowie die Verschiedenheit der Nährmedien. Eine positive Auswirkung der Keimvorschädigung stellten z. B. Pruul und McDonald (10) fest. Nachdem sie einen Stamm von E. coli 10 Minuten lang mit der vierfachen MHK von Chloramphenicol vorgeschädigt hatten, kam es in einer Mixtur mit 10 % aktivem humanem Serum sowie humanen neutrophilen Granulozyten zu einer gegenüber nicht vorgeschädigten Keimen verstärkten Abtötung. Dieser Effekt korrelierte positiv mit der Antibiotikumkonzentration und der Dauer der Vorschädigung. Milatovic (6) untersuchte die Beeinflussung der Phagozytose von Staph. aureus durch Vorschädigung der Keime mit sechs verschiedenen Antibiotika. Ebenso wie Pruul verwendete sie hierzu humane neutrophile Granulozyten und setzte der Mixtur 10 % aktives humanes Serum hinzu. Die Vorschädigung der Keime erfolgte über Nacht mit Konzentrationen von 1/3 MHK und weniger. Mit den Antibiotika Clindamycin und Doxycyclin zeigte sich eine Erhöhung der Phagozytoserate gegenüber nicht vorbehandelten Keimen. Dies war noch deutlich bis zu Konzentrationen von

3,1 % bzw. 1,6 % der MHK. Im Gegensatz hierzu blieb bei den übrigen Antibiotika Cefotiam, Vancomycin, Piperacillin und Penicillin G die Phagozytoserate unverändert. Da diese vom Wirkungsmechanismus her zur Gruppe der Zellwandsyntesehemmer, die beiden anderen jedoch ebenso wie das von Pruul verwendete Chloramphenicol zu den Hemmern der Proteinsynthese gehören, ist ein Zusammenhang zwischen der Steigerung der antibakteriellen Aktivität und dem Wirkungstyp des Antibiotikums zu vermuten. Auch die Ergebnisse einer Untersuchung von Horne und Tomasz (5) zeigen eine solche Abhängigkeit vom Wirkungstyp der Antibiotika. Im Gegensatz zu den beiden oben angeführten Untersuchungen konnte hier mit den Proteinsynthesehemmern Chloramphenicol und Gentamycin die antibakterielle Aktivität der Leukozyten nicht gesteigert werden; wohl aber die Zellwandsynthesehemmer Penicillin, Piperacillin, Methicillin und Vancomycin zeigten eine solche Steigerung. Bemerkenswert ist diese Gegensätzlichkeit insofern, als die Versuchsbedingungen im wesentlichen ähnlich waren; die untersuchten Keime waren hier jedoch B-Streptokokken

Daß nicht nur die Leukozytenfunktion durch antibiotische Vorschädigung beeinflußt wird, konnten Taylor et al. (14) zeigen. Sie befaßten sich mit den Auswirkungen antibiotischer Vorschädigung von E. coli Bakterien auf die nachfolgende antibakterielle Aktivität aktiven humanen Serums. Sie konnten zeigen, daß die drei getesteten Stämme, die zuvor seroresistent waren, nach 20-stündiger Vorschädigung mit subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen (Mecillinam und Pivmecillinam) in 75 %-igem Serum abgetötet wurden, also serosensibel geworden waren.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die antibiotische Vorschädigung unter bestimmten

Umständen positiven Einfluß auf die antibakterielle Aktivität von Leukozyten und Serum ausübt. Um nähere Aussagen über die Bedeutung der verschiedenen Faktoren wie z. B. Wirkungstyp des Antibiotikums, Keimspecies oder die Zusammensetzung der Mixtur machen zu können, wären weitere Untersuchungen möglichst einheitlicher Methodik erforderlich.

Daß die Aktivität der körpereigenen Abwehrkräfte gegenüber antibiotisch vorgeschädigten Keimen auch spenderspezifischen Schwankungen unterworfen ist, zeigt sich in Abbildung 23. Während hier eine Erhöhung der Leukozytenkonzentration von 5×10^6 L/ml auf 10^7 L/ml nur eine mäßige Wachstumsverzögerung mit sich bringt, kommt es unter Verwendung von Leukozyten und Plasma eines anderen Probanden bei nahezu gleicher Leukozytenkonzentration zu einer deutlichen Bakterizidie. Spenderspezifische Unterschiede in den Versuchsergebnissen fanden auch Adam et al. (2,3). Sie konnten zeigen, daß die durch antibiotische Keimvorschädigung bedingte Zunahme der Phagozytoseaktivität humaner Monozyten in Abhängigkeit vom Spender differierte. - Grundsätzlich ist anzunehmen, daß Unterschiede dieser Art sowohl durch spezifische, an den einzelnen Spender gebundene Faktoren als auch durch intraindividuelle Schwankungen bedingt sind.

Eine wichtige Rolle im Zusammenspiel von Antibiotikum und körpereigener Abwehr bei der Bekämpfung von Erregern spielen auch die thermolabilen Substanzen des Plasmas, die bei dessen Inaktivierung zerstört werden. Dies ist aus den Abbildungen 17 und 18 erkennbar. Hier zeigt sich im aktiven Plasma eine deutliche Bakterizidie, die sich auch nach der Elimination des Antibiotikums fortsetzt, obwohl die Keime

plasmaresistent sind. Demgegenüber ist eine antibakterielle Potenz des inaktivierten Plasmas kaum festzustellen. So wachsen die Keime hierin sofort nach Elimination des Antibiotikums wieder aus. Auch Leukozyten vermögen dieses Wachstum nicht zu verzögern. Die Bedeutung aktiven Serums bei den Wechselwirkungen zwischen Abwehrsystem und Antibiotikum stellten auch Taylor et al. (13) fest, indem sie zeigten, daß seroresistente E. coli Bakterien durch antibiotische Vorbehandlung mit Mecillinam und Pivmecillinam serosensibel wurden. Adam (1) stellte eine Steigerung der Wirksamkeit von Gentamycin und Polymyxin durch thermolabile Serumfaktoren fest. Pruul und McDonald (10) zeigten die Relevanz dieser Serumbestandteile für die Steigerung der antibakteriellen Aktivität von Granulozyten gegenüber E. coli durch Chloramphenicol. Sie untersuchten die Wirkung von Granulozyten gegenüber Keimen, die 10 Minuten lang mit der vierfachen MHK des Antibiotikums vorgeschädigt worden waren. Dabei stellten sie eine Erhöhung der antibakteriellen Aktivität nur in den Proben fest, die 10 % aktives Serum enthielten. In einer Mixtur mit 10 % inaktiviertem Serum und Granulozyten blieb hingegen die antibakterielle Aktivität unverändert. Ebenso zeigte eine leukozytenfreie Lösung mit 10 % aktivem Serum keinen Steigerungseffekt. Diese Ergebnisse zeigen klar, daß der synergistische Effekt zwischen Chloramphenicol und der körpereigenen Abwehr weder auf einer Beeinflussung der Leukozyten noch des Serums alleine beruht; vielmehr ist die Aktivitätssteigerung der Granulozyten an die Wirkung der thermolabilen Serumfaktoren gebunden. Man kann daher annehmen, daß der phagozytosefördernde Effekt auf einer Chloramphenicol-indu-

zierten Verstärkung der Opsonisierung der Keime beruht.

Außer Leukozyten und Plasma scheinen noch weitere Blutbestandteile am antibakteriellen Geschehen beteiligt zu sein. Dies zeigt sich in Abbildung 17, wonach im leukozytenreduzierten Vollblut die Bakterizidie stärker ist als im leukozytenhaltigen Plasma, obwohl im Vollblut die Konzentation mit 1,2 x 10^6 L/ml nur 16 % derjenigen im Plasma beträgt. Man kann annehmen, daß die Erythrocyten für diese Verstärkung der antibakteriellen Aktivität mit verantwortlich sind, indem sie eine Erhöhung der Konzentration verfügbaren Sauerstoffs bewirken und dadurch den oxydativen Stoffwechsel aktivieren. Diese Annahme stützt sich auf eine Untersuchung von Pruul (13), wonach die Sauerstoffversorgung für die intraleukozytäre Bakterizidie phagozytierter Keime von Bedeutung ist. Er konnte zeigen, daß diese intrazelluläre Abtötung durch einen Inhibitor des oxydativen Stoffwechsels (Phenylbutazon) gehemmt wird.

Aus den obigen Erörterungen ergibt sich, daß für die Beeinflussung der Wirksamkeit von Antibiotika durch körpereigene Abwehrmechanismen das Zusammenspiel vieler Faktoren untereinander von Bedeutung ist. Daraus ist zu folgern, daß durch isolierte Untersuchung der Interaktionen zwischen Antibiotika und speziellen Faktoren des Abwehrsystems die in vivo-Situation, charakterisiert durch das Zusammenwirken aller maßgeblichen Faktoren eines Individuums, nur unzureichend simuliert wird. Unterstützt durch die Kontinuität der hier gezeigten Versuchsergebnisse mit Vollblut ergibt sich die Konsequenz, zukünftig Versuche im Vollblut durchzuführen, um der Situation

in vivo näher zu kommen. Es erscheint sinnvoll, mit Vollblut eines Probanden vom gleichen Entnahmezeitpunkt verschiedene Antibiotika zu untersuchen, denn hierdurch wird die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse verbessert,und es werden sowohl spenderspezifische als auch intraindividuelle Schwankungen ausgeschaltet.

V. Zusammenfassung

Es wurde die Beeinflussung der antibakteriellen Aktivität menschlichen Blutes gegenüber den Erregern Escherichia coli und Klebsiella pneumoniae durch Antibiotika untersucht. Die verwendeten Antibiotika waren Ampicillin, Mezlocillin und Penicillin G. Die getesteten Stämme hatten sich in Vorversuchen als seroresistent erwiesen.

Die Versuchsergebnisse zeigten eine synergistische Wirkung zwischen Ampicillin und Vollblut gegenüber Klebsiella pneumoniae. Auch mit Mezlocillin gegenüber Klebsiella pneumoniae sowie Ampicillin und Mezlocillin gegenüber Escherichia coli gab es in einzelnen Versuchen synergistische Effekte. Die isolierte Betrachtung der Funktion von Leukozyten gegenüber den Keimen nach antibiotischer Vorschädigung brachte keine einheitlichen Ergebnisse. Während sich in einigen Versuchen die antibakterielle Aktivität der Leukozyten verstärkte, änderte sie sich in anderen nicht. Weiterhin wurde deutlich, daß spenderspezifische Faktoren für die Abwehrkraft von Leukozyten und Plasma gegenüber antibiotisch vorgeschädigten Keimen von beachtlicher Bedeutung sind. Die Erkenntnis, daß die Beeinflussung der antibakteriellen Aktivität des Blutes durch antibiotische Keimvorschädigung nicht nur auf der Funktionsänderung von Leukozyten alleine beruht, sondern von vielen, sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren abhängig ist, veranlaßt zu der Feststellung, daß nur Untersuchungen in Vollblut genauere Aufschlüsse über die in vivo-Situation geben können.

VI. Literaturverzeichnis

1. Adam, D., Staber, F., Belohradsky, B. H., Marget, W.:
Effect of Dihydrostreptomycin on Phagocytosis of Mouse-Peritoneal Macrophages In Vitro
Infection and Immunity, 5 (1972), 537 - 541

2. Adam, D., Schaffert, W., Marget, W.:
Enhanced In Vitro Phagocytosis of Listeria monocytogenes by Human Monocytes in the Presence of Ampicillin, Tetracycline and Chloramphenicol
Infection and Immunity, 9 (1974), 811 - 814

3. Adam, D.:
Enhanced In Vitro Phagocytosis of different Pathogens by Human Monocytes in the Presence of Antibiotics
unveröffentlicht

4. Friedmann, H., Warren, G. H.:
Enhanced Susceptibility of Penicillin-Resistant Staphylococci to Phagocytosis after In Vitro Incubation with Low Doses of Nafcillin
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1974, 146: 707 - 711

5. Horne, D., Tomasz, A.:
Hypersusceptibility of Penicillin-Treated Group B Streptococci to Bactericidal Activity of Human Polymorphonuclear Leukocytes
Antimicrobial Agents and Chemotherapie 19 (1981), 745 - 753

6. Milatović, D.:
Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on the Phagocytosis of Staphylococcus aureus
European Journal of Clinical Microbiology, April 1982, 97 - 101

7. Nishida, M, Mine, Y., Nonoyama, S., Yokota, Y.:
Effect of Antibiotics on the Phagocytosis and Killing of Pseudomonas aeruginosa by Rabbit Polymorphonuclear Leukocytes
Chemotherapie 22 (1976), 203 - 210

8. Nishida, M., Mine, Y., Nonoyama, S.:
Relationship between the Effect of Carbenicillin on the Phagocytosis and Killing of Proteus Mirabilis by Polymorphonuclear Leukocytes and Therapeutic Efficacy
Journal of Antibiotics,Vol. 31, July 1978, 719 - 724

9. Oberzill, W.:
Mikrobiologische Analytik
Nürnberg 1967

10. Pruul, H., McDonald, P. J.:
Enhancement of Leukocyte Activity Against Escherichia coli After Brief Exposure to Chloramphenicol
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 16 (1979), 695 - 700

11. Shah, P. M., Fischer, M., Schmidt-Weber, H., Stille, W.:
Septikämische Erkrankungen bei Patienten mit Abwehrschwäche
Münchener Medizinische Wochenschrift 125. Jahrg. 1983, 216 - 218

12. Solberg, C. O.:
Effect of Antibiotics on the Bactericidal Activity of Human Leukocytes
Infection 6 (1978), Suppl. 1, 116 - 119

13. Strauss, R. R., Paul, B. B., Sbarra, A. J.:
Effect of Phenylbutazone on Phagozytosis and Intracellular Killing by Guinea Pig Polymorphonuclear Leukocytes
Journal Bacteriology 96 (1968), 1982 - 1990

14. Taylor, P. W., Gaunt, H., Unger, F. M.:
Effect of Subinhibitory Concentrations of Mecillinam on the Serum Susceptibility of Escherichia coli Strains
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, May 1981, 786 - 788

15. Vömel, W.:
Experimentelle Grundlagen der Entwicklung antibakterieller Chemotherapeutika
Therapiewoche 1965, 1081 - 1083

ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe - Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

UNTERSUCHUNG ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG KÖRPEREIGENER ABWEHRMECHANISMEN DURCH DIE ANTIBIOTIKA AMPICILLIN, MEZLOCILLIN UND PENICILLIN G GEGENÜBER KLEBSIELLA PNEUMONIAE UND ESCHERICHIA COLI

im Zentrum der Inneren Medizin der Johann Wolfgang Goethe - Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von Priv. Doz. Dr. med. P. M. Shah ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Kall, den 08. Juni 1983

Karl Theodor Vossemer

LEBENSLAUF

Am 09.12.1952 wurde ich als Sohn der Eheleute Wilhelm Vossemer und Elisabeth, geborene Seidenfaden, in Kallmuth geboren.

Von 1959 bis 1966 besuchte ich die Volksschule in Kallmuth, von 1966 bis 1967 die Volksschule in Zingsheim. Dort erhielt ich nach dem 9. Schuljahr den Hauptschulabschluß. Anschließend arbeitete ich ein Jahr lang auf dem landwirtschaftlichen Betrieb meines Vaters und besuchte die landwirtschaftliche Berufsschule in Kall. Von August 1968 bis Juli 1972 war ich Schüler des Steyler Aufbaugymnasiums in Geilenkirchen. Aufgrund meiner besonderen Neigung zu den Naturwissenschaften wechselte ich das Gymnasium und besuchte ab August 1972 das mathematisch-naturwissenschaftliche Aufbaugymnasium der Stadt Köln. Dort machte ich im Juni 1975 das Abitur.

Zum Sommersemester 1976 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main. Nach bestandener naturwissenschaftlicher Vorprüfung am 23. März 1977 legte ich am 22. September 1978 die zahnärztliche Vorprüfung ab. Nach Abschluß der zahnärztlichen Prüfung am 09. Juli 1981 erhielt ich die Bestallung als Zahnarzt am 15. Juli 1981. Den experimentellen Teil der vorliegenden Dissertation absolvierte ich von Juli bis Dezember 1981 im Zentrum der Inneren Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter Leitung von Privatdozent Dr. med. P. M. Shah. Seit dem 04. Januar 1982 bin ich in der Praxis Dr. Jahnke in Mechernich als Assistenzzahnarzt tätig.

Seit dem 01. April 1975 bin ich mit der Lehrerin Katharina Vossemer, geb. Blens, verheiratet. Wir haben zwei Kinder im Alter von drei und eineinhalb Jahren.

Kall, den 08. Juni 1983

Karl Theodor Vossemer

Karl Theodor Vossemer